

# **Einfluss des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors I auf die Androgenrezeptor-Signaltransduktion in Prostatakrebszellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften  
der Technischen Universität Dresden

von

**Dipl.-Biologin Siw Schmidt**  
geboren am 04.09.1978 in Freiberg

angefertigt am

Institut für Toxikologie und Genetik  
Forschungszentrum Karlsruhe

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Andrew C. B. Cato  
Prof. Dr. rer. nat. Günter Vollmer  
Prof. Dr. rer. nat. Aria Baniahmad

Eingereicht am: 23.07.2007

Rigorosum und Disputation am: 07.11.2007





*Wer mit der Wissenschaft sich sonnt,  
ganz gleich in welchen Themen,  
erweitert mit dem Horizont  
die Vielzahl von Problemen.*

*Aus "Einsichten-Aussichten-Absichten" von Hans Horn*



## Zusammenfassung

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss der Wachstumsfaktoren IGF-I, EGF und dem Zytokin IL-6 auf den Androgenrezeptor-Signalweg zeigten in verschiedenen Prostatakarzinomzelllinien schon nach zwei Stunden eine deutliche Degradation des Androgenrezeptor-Proteins. Die ausschließlich auf Protein-Ebene stattfindende, Wachstumsfaktor-induzierte negative Regulation des Androgenrezeptors konnte durch einen schnellen Androgeneffekt wieder aufgehoben werden. Mittels Luziferase-Reporter-Gen-Assays wurde kein Einfluss der Wachstumsfaktorwirkung auf die transkriptionelle Aktivität des Androgenrezeptors nachgewiesen. Darüber hinaus konnte eine signifikant reprimierende Wirkung durch IGF-I und EGF in Kombination mit geringen Mengen DHT beobachtet werden. Weitere Resultate dieser Arbeit deuten auf einen, durch den PI3-Kinase-Signalweg vermittelten, proteasomalen Abbauprozess des Rezeptors hin. Da die Suppression der *downstream* gelegenen Proteinkinase Akt keine Veränderung hinsichtlich der Degradation aufwies, konzentrierte sich die weiterführende Arbeit auf eine mögliche direkte Regulation des Androgenrezeptors durch die PI3-Kinase.

Unter Verwendung von rekombinanten GST-Fusionsproteinen konnte in Interaktionsstudien unter *in vitro* Bedingungen eine Phosphotyrosin-unabhängige Bindung zwischen der C-SH2-Domäne der p85-Untereinheit der PI3-Kinase und dem N- und C-Terminus des Androgenrezeptors nachgewiesen werden. Durch die nähere Charakterisierung dieser Bindungsbereiche mit Hilfe von Peptidarrays und anschließenden Alanin-Substitutionen war es möglich, für den N-Terminus 18, für den C-Terminus des Androgenrezeptors 6 und für die p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase 11 Aminosäuren zu identifizieren. Die durch gezielte Punktmutagenese an diesen Aminosäurepositionen hergestellten Androgenrezeptor-Einzel- und -Mehrfachmutanten wiesen in Bindungsstudien dennoch Interaktion zur PI3-Kinase auf.

Eine von Anderson und Kollegen postulierte Phosphotyrosin-unabhängige Bindung der SH2-Domänen der p85-Untereinheit der PI3-Kinase durch sogenannte „basic-X-basic“-Motive wurde ebenfalls in Interaktionstests zwischen der PI3-Kinase und dem Androgenrezeptor überprüft.

Aufgrund der Tatsache, dass einige der identifizierten Aminosäuren auf dem Androgenrezeptor Teil eines „basic-X-basic“-Bindungsmotives sind, wurden Kombinationsmutanten generiert, die sowohl im N-Terminus als auch im C-Terminus des Androgenrezeptors ein bzw. zwei zerstörte „basic-X-basic“-Motive enthielten. Untersuchungen zum Bindungsverhalten dieser Mutanten zeigten zwar weiterhin Interaktion zur p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase, jedoch der durch Western-blot-Analyse überprüfte IGF-I-induzierte Degradationseffekt des Androgenrezeptor-Proteins konnte mit zwei der verwendeten Androgenrezeptor-Kombinationsmutanten nicht mehr beobachtet werden.



## Abstract

In this work the influence of the growth factors IGF-I, EGF and the cytokine IL-6 on androgen receptor signalling pathway showed a clear degradation of the androgen receptor protein in different prostate cancer cell lines after two hours. The growth factor-induced negative regulation of the androgen receptor takes place exclusively at the protein level and could be abolished by a rapid androgen action.

No effect of the growth factors on the transcriptional activity of the androgen receptor was detected. A significantly diminished effect by IGF-I and EGF in combination with low amounts of DHT was however observed on the transactivation function of the androgen receptor. Further results suggest a proteasome-mediated degradation of the androgen receptor by PI3-kinase signalling pathway. A knockdown of the downstream protein kinase Akt did not abrogate the IGF-I-mediated degradation of the androgen receptor. Thus further work was focussed on a possible direct interaction of the androgen receptor with the PI3-kinase.

A phosphotyrosine independent interaction between the C-SH2 domain of the p85 subunit of the PI3-kinase and the C- and N-termini of the androgen receptor was shown by *in vitro* interaction studies with recombinant GST fusion proteins. It was possible to identify 18 binding sites in the N-terminus, 6 in the C-terminus of the androgen receptor and 11 possible binding sites in the p85-C-SH2 PI3-kinase subunit by detailed characterisation of the binding region using peptide arrays and subsequent alanine substitutions. Single and multiple mutants of these binding sites did not alter binding of the androgen receptor to the PI3-kinase.

A phosphotyrosine-independent motif bound by the SH2 domains of the p85 PI3-kinase, a “basic-X-basic” sequence proposed by Anderson and colleagues was identified on the androgen receptor as an interaction site for p85-C-SH2. Single or multiple mutations that destroyed the “basic-X-basic” motifs both in the N- and C-termini of the androgen receptor were generated. Binding studies showed that these mutants still interacted with the p85-C-SH2 domain of the PI3-kinase. However Western-blot-analysis showed that IGF-I-induced degradation effect of the androgen receptor could not be observed with two of the androgen receptor combination mutants.



# Inhalt

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Struktur des humanen Androgenrezeptors.....	2
1.2	Genomische Wirkungsweise des Androgenrezeptors .....	4
1.3	Nicht-genomische Wirkungsweise des Androgenrezeptors .....	9
1.4	Ligandenunabhängige Wirkungsweise des Androgenrezeptors ..	12
1.5	Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signaltransduktion.....	15
1.6	Ursachen für die Entwicklung hormonrefraktärer Prostatakarzinome.....	18
<b>2</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
3.1	Material .....	23
3.1.1	Chemikalien.....	23
3.1.2	Zellkulturchemikalien, Wachstumsfaktoren und Zytokine .....	25
3.1.3	Radiochemikalien .....	25
3.1.4	Transfektionsreagenzien .....	26
3.1.5	Membranen und Filme.....	26
3.1.6	Kits.....	26
3.1.7	Enzyme.....	26
3.1.8	Androgene .....	27
3.1.9	Antikörper .....	27
3.1.9.1	Primäre Antikörper .....	27
3.1.9.2	Sekundäre Antikörper.....	28
3.1.10	Oligonukleotide.....	29
3.1.11	Plasmide und Plasmidkonstrukte.....	31
3.1.12	Bakterienstämme.....	38
3.1.13	Zelllinien .....	39
<b>3.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>39</b>
3.2.1	Allgemeine Methoden zur Behandlung von Nukleinsäuren .....	39
3.2.1.1	Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren.....	39
3.2.1.2	Präzipitation von Nukleinsäuren aus wässriger Lösung .....	40
3.2.1.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	40
3.2.2	DNA-Methoden.....	40

3.2.2.1	Fragmentierung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	40
3.2.2.2	Agarose-Gelelektrophorese .....	41
3.2.2.3	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	41
3.2.2.4	Dephosphorylierung von 5´-DNA-Überhängen.....	42
3.2.2.5	T4 DNA-Polymerase zur Herstellung von <i>blunt ends</i> .....	42
3.2.2.6	Ligation von DNA-Fragmenten .....	43
3.2.2.7	Transformation chemisch kompetenter Bakterien .....	43
3.2.2.8	Plasmid-DNA-Minipräparation .....	43
3.2.2.9	Plasmid-DNA-Maxipräparation .....	44
3.2.2.10	Generierung von gezielten Punktmutationen .....	45
3.2.3	RNA-Methoden .....	45
3.2.3.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen .....	45
3.2.3.2	Auftrennung von RNA durch Agarose-Gelelektrophorese .....	46
3.2.3.3	cDNA-Synthese durch Reverse Transkription .....	47
3.2.3.4	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR-Analyse .....	47
3.2.4	Protein-Methoden .....	49
3.2.4.1	Präparation von Gesamtzelllysat.....	49
3.2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	49
3.2.4.3	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels SDS- Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) .....	50
3.2.4.4	Coomassie-Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen .....	50
3.2.4.5	Transfer von Proteinen auf Membranen und Detektion mit spezifischen Antikörpern ( <i>Western blot</i> ) .....	51
3.2.4.6	Lösen von Immunkomplexen ( <i>Strippen</i> von <i>Western blot</i> Membranen) .....	52
3.2.5	Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe von GST- Fusionsproteinen .....	52
3.2.5.1	Produktion und Reinigung von Glutathion-S-Transferase- Fusionsproteinen .....	52
3.2.5.2	<i>In vitro</i> Transkription/Translation von Proteinen .....	53
3.2.5.3	GST-Fusionsprotein-Interaktionstest ( <i>pull down</i> ) .....	54
3.2.6	Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen durch Peptidarrays ..	55



3.2.7	Identifizierung einzelner interagierender Aminosäuren durch Substitution gegen Alanin ( <i>Alanin-Scan</i> ) .....	57
3.2.8	Bakterien-Methoden .....	58
3.2.8.1	Einfrieren von Bakterien .....	58
3.2.8.2	Herstellung von Selektivagarplatten .....	58
3.2.9	Zellkultur .....	58
3.2.9.1	Passagieren von Zellen .....	58
3.2.9.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	59
3.2.10	Transfektion eukaryontischer Zellen .....	59
3.2.10.1	Transiente Transfektion von siRNA mit <i>HiPerFect Transfection Reagent</i> .....	59
3.2.10.2	Transiente Transfektion mit <i>FuGENE<sup>®</sup> 6</i> für <i>Western blot</i> -Analyse ...	60
3.2.10.3	Transiente Transfektion mit <i>FuGENE<sup>®</sup> 6</i> für die Luziferase-Reportergen-Analyse .....	60
3.2.10.4	Stabile Transfektion .....	61
3.2.11	Analyse der Genexpression durch Messung der Luziferaseaktivität ...	62
3.2.11.1	Luziferase-Reportergen-Analyse .....	62
3.2.11.2	Messung der <i>Photinus pyralis</i> -Luziferase-Aktivität .....	62
3.2.11.3	Messung der <i>Renilla reniformis</i> -Luziferase-Aktivität .....	63
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>65</b>
<b>4.1</b>	<b>Einfluss von Wachstumsfaktoren auf den Androgenrezeptor .....</b>	<b>65</b>
4.1.1	Effekt von IGF-I, EGF und IL-6 auf den Androgenrezeptor in verschiedenen Prostatakrebszelllinien .....	65
4.1.2	Zeitlicher Verlauf der Androgenrezeptor-Degradation .....	67
4.1.3	Einfluss von IGF-I auf die Expression des Androgenrezeptors .....	68
4.1.4	Untersuchungen zum Abbauweg des Androgenrezeptor-Proteins .....	69
4.1.5	Überprüfung des vermittelnden Signaltransduktionsweges .....	70
4.1.6	Rolle von Akt bei der Wachstumsfaktor-induzierten negativen Regulation des Androgenrezeptors .....	72
<b>4.2</b>	<b>Interaktionsstudien zwischen PI3-Kinase und Androgenrezeptor .....</b>	<b>74</b>
4.2.1	Bindungsverhalten zwischen verschiedenen Domänen der p85-Untereinheit der PI3-Kinase und dem Androgenrezeptor .....	74

4.2.2	Untersuchung verschiedener Androgenrezeptor-Deletionsmutanten auf Bindung mit der p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase .....	76
<b>4.3</b>	<b>Charakterisierung der Bindungsstellen im N-und C-Terminus des Androgenrezeptors .....</b>	<b>78</b>
4.3.1	Identifizierung der Bindungsamino-säuren mittels Peptidarray und nachfolgender Alanin-Substitution .....	78
4.3.2	Dreidimensionale Darstellung der Hormonbindedomäne des Androgenrezeptors mit den identifizierten Aminosäuren .....	84
4.3.3	Gezielte Punktmutagenese der identifizierten Aminosäuren in der Hormonbindedomäne des Androgenrezeptors .....	85
4.3.4	Überprüfung der Punktmutanten auf Bindung zur p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase .....	87
4.3.5	Abgleich der identifizierten Aminosäuren mit bereits bekannten Mutationen klinischen Phänotyps .....	88
4.3.6	Generierung und Überprüfung der Punktmutanten mit relevantem klinischen Phänotyp.....	89
<b>4.4</b>	<b>Charakterisierung der Bindungsstellen auf der p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase.....</b>	<b>90</b>
4.4.1	Identifizierung der Bindungsamino-säuren mittels Peptidarray und nachfolgender Alanin-Substitution .....	90
4.4.2	Dreidimensionale Darstellung der p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase mit den identifizierten Aminosäuren.....	91
4.4.3	Vergleich der identifizierten Aminosäuren mit dem Phosphotyrosin-Bindungsmotiv der p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase.....	92
4.4.4	Auswirkung einer Punktmutation in dem Phosphotyrosin-Bindungsmotiv der p85-C-SH2-Domäne auf die Interaktion mit dem Androgenrezeptor .....	94
<b>4.5</b>	<b>Phosphotyrosin-unabhängiges Bindungsmotiv .....</b>	<b>95</b>
4.5.1	Bindungsstudien mutierter „basic-X-basic“-Motive im N-und C-Terminus des Androgenrezeptors.....	97
4.5.2	Einfluss von IGF-I auf die „basic-X-basic“-Punktmutanten in Bezug auf die Degradation des Androgenrezeptors .....	98
<b>4.6</b>	<b>Wirkung von Androgenen auf die IGF-I-vermittelte negative Regulation des Androgenrezeptors .....</b>	<b>100</b>

4.7	Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Transkriptionsaktivität des Androgenrezeptors .....	103
5	Diskussion .....	107
5.1	Wachstumsfaktor-induzierte negative Regulation des Androgenrezeptor-Proteins und deren Aufhebung durch Androgen.....	108
5.2	PI3-Kinase-vermittelter proteasomaler Androgenrezeptor- Abbau .....	110
5.3	Interaktion der p85-Untereinheit der PI3-Kinase mit dem Androgenrezeptor.....	111
5.4	Phosphotyrosin-unabhängige Interaktion der p85-C-SH2- Domäne der PI3-Kinase und dem Androgenrezeptor.....	115
5.5	Einfluss der Wachstumsfaktoren auf die transkriptionelle Aktivität des Androgenrezeptors .....	117
5.6	Einfluss der Wachstumsfaktoren auf eine mögliche weitere Funktion des Androgenrezeptors .....	118
6	Referenzen .....	121
7	Abkürzungen und Einheiten .....	149
8	Anhang .....	153
9	Danksagung .....	159



# 1 Einleitung

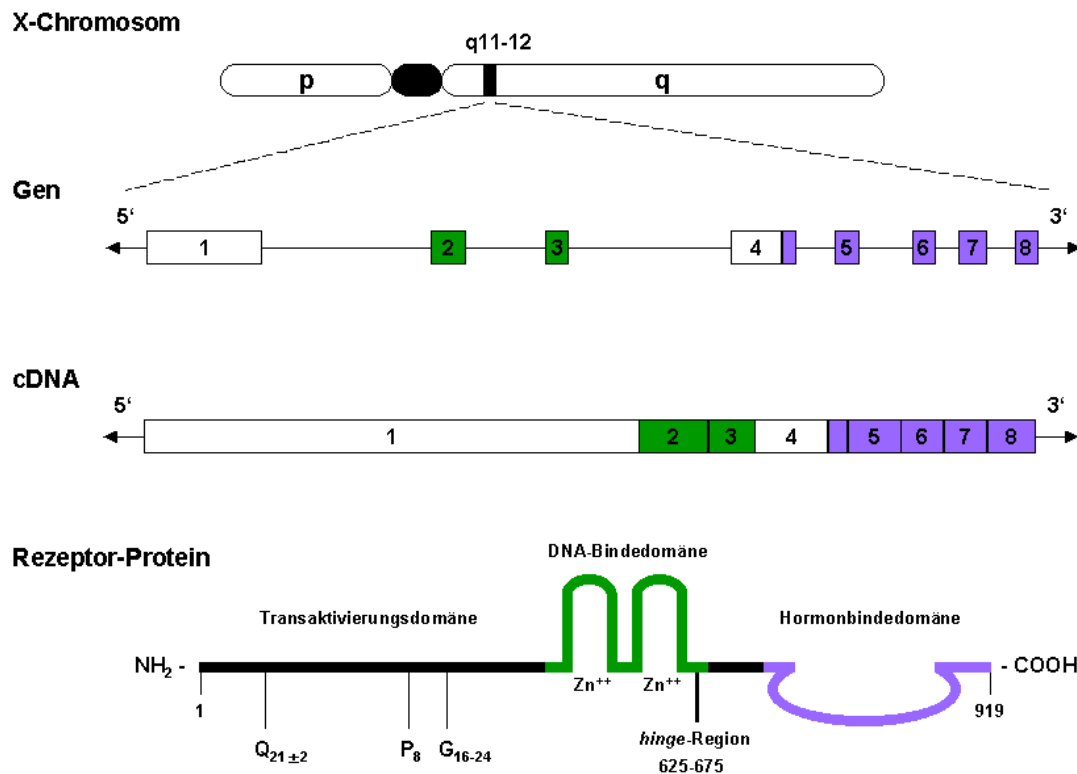
Das Prostatakarzinom ist in Europa und Nordamerika nach dem Bronchialkarzinom der zweithäufigste maligne Tumor des Mannes (Hamdy und Thomas, 2001). Nach Schätzungen des Robert Koch-Institutes liegt die Inzidenz in Deutschland bei 49.000 Neuerkrankungen pro Jahr mit weiterhin steigender Tendenz (Robert Koch-Institut, 2007). Der klinische Verlauf des Prostatakarzinoms ist vor allem von der Entstehung von Metastasen und von einer möglichen Resistenz gegenüber der Androgenablation und Antiandrogentherapie abhängig. Da primäre Prostatakarzinome in ihrem Wachstum meist androgenabhängig sind, ist die Ansprechrate auf eine Antiandrogentherapie entsprechend hoch und liegt bei 75 %. Mit der Antiandrogentherapie wird versucht, die Konzentration von frei zirkulierenden Androgenen herabzusetzen und die transkriptionelle Funktion des Androgenrezeptors zu blockieren. Bei den meisten Patienten kommt es jedoch trotz einer zunächst erfolgreichen Behandlung zu einer erneuten Proliferation und Metastasierung des Prostatakarzinoms. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass androgenunabhängig wachsende Prostatakrebszellen immer noch von einem funktionellen Androgenrezeptor abhängig sind (Chen *et al.*, 2004; Isaacs und Isaacs, 2004). Der Androgenrezeptor vermittelt als intrazellulärer Rezeptor die Wirkung der Androgene, die als männliche Geschlechts- oder Keimdrüsenhormone bezeichnet werden. Sie sind essentiell für die normale Entwicklung und Aufrechterhaltung der sekundären Geschlechtsmerkmale und der Spermatogenese des Mannes (Roy *et al.*, 1999). Zwischen sechs und acht Milligramm Testosteron werden täglich im erwachsenen männlichen Organismus synthetisiert, davon ungefähr 95 % in den Leydig'schen Zwischenzellen des Hodens. Daneben wird ein geringer Anteil des zirkulierenden Testosterons in der *Zona reticularis* der Nebennierenrinde produziert.

Der Entwicklung androgenunabhängig wachsender Prostatakrebszellen liegen verschiedene Mechanismen zugrunde, die letztlich dafür verantwortlich sind, dass das Prostatakarzinom nur eine gewisse Zeit auf die Hormonmanipulation reagiert (Jenster, 2000). Eine bedeutende Rolle bei hormonrefraktären Prostatakarzinomen wird dabei dem Einfluss von Wachstumsfaktoren zugeschrieben. In fortgeschrittenem hormonunabhängigen und metasta-

sierenden Prostatakrebs sind z.B. EGF (*epidermal growth factor*), KGF (*keratinocyte growth factor*) und IGF-I (*insulin-like growth factor*) und deren entsprechende Rezeptoren überexprimiert und induzieren die transkriptionelle Aktivität des Androgenrezeptors in Abwesenheit von Androgenen (Culig *et al.*, 1994 und 2000; Nickerson *et al.*, 2001). Eine erhöhte IGF-I-Konzentration im Blut steht ebenfalls in Verbindung mit einem höheren Risiko, an Prostatakrebs zu erkranken (Hsing *et al.*, 2001). Die Inhibierung des IGF-I-Signaltransduktionsweges durch die Hemmung des Rezeptors unterdrückt *in vitro* und *in vivo* das Wachstum von Prostatazellen und erhöht die Zugänglichkeit für Krebsmedikamente (Burfeind *et al.*, 1996; Lamharzi *et al.*, 1998; Hellawell *et al.*, 2003). Dies verdeutlicht, dass Wachstumsfaktoren einen wesentlichen Einfluss auf die Signaltransduktion des Androgenrezeptors ausüben.

## 1.1 Struktur des humanen Androgenrezeptors

Der Androgenrezeptor (AR) wird in die Gruppe der klassischen Steroidhormonrezeptoren eingeordnet. Zu dieser Familie gehören unter anderem der Östrogen-, der Progesteron-, der Glukokortikoid- und der Mineralkortikoidrezeptor (Laudet *et al.*, 1992; Mangelsdorf *et al.*, 1995). Sie beeinflussen als ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren die Transkription spezifischer Zielgene über eine direkte Interaktion mit regulatorischen Sequenzen in der DNA (Truss und Beato, 1993). Allgemein weisen Steroidhormonrezeptoren eine hohe Homologie in ihrer Gen- und Proteinstruktur auf und sind modular aufgebaut. Das Androgenrezeptor-Gen ist auf dem X-Chromosom an Position Xq11-q12 lokalisiert (Wieacker *et al.*, 1987). Es umfasst etwa 90 Kilobasen und besteht aus acht Exons. Die cDNA hat eine Größe von ca. 2,8 Kilobasen und kodiert für ein Protein von 910 bis 919 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 110 bis 112 kDa (Chang *et al.*, 1988; Lubahn *et al.*, 1988; Trapmann *et al.*, 1988). Die Größe der proteinkodierenden Region variiert durch die Länge der homopolymeren Bereiche im N-Terminus (Gerber *et al.*, 1994). Vier deutlich voneinander abgegrenzte funktionelle Domänen bilden den Androgenrezeptor und vermitteln unterschiedliche Aufgaben (Simental *et al.*, 1991; Cude *et al.*, 1999). Die Struktur des humanen Androgenrezeptors ist in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt.



**Abb. 1.1: Schematische Abbildung des X-Chromosoms, des Androgenrezeptor-Gens, der cDNA und des Androgenrezeptor-Proteins.** Das Androgenrezeptor-Gen ist auf dem X-Chromosom an Position Xq11-q12 lokalisiert. Das Gen besteht aus acht Exons und sieben Introns, die ca. 2,8 kb an cDNA exprimieren. Das Androgenrezeptor-Protein besteht aus ca. 919 Aminosäuren, wobei die Zahl durch die homopolymeren Regionen im N-Terminus variieren kann (Q<sub>21±2</sub>=variable Glutaminhomopolymerfolge von 21±2 Glutamin; P<sub>8</sub>=Prolinhomopolymerfolge von acht Prolin; G<sub>16-24</sub>=variable Glycinhomopolymerfolge von 16 bis 24 Glycin). Das Protein wird in vier Domänen eingeteilt: aminoterminaler Transaktivierungsdomäne, DNA-Bindedomäne (DBD), *hinge*-Region (Aminosäure 625 bis 675) und carboxyterminale Hormonbindedomäne (HBD). Zn<sup>++</sup> zeigt die Position der "Zinkfinger" an. Modifiziert nach Quigley *et al.*, 1995.

Die aminoterminaler Transaktivierungsdomäne stellt mit bis zu 558 Aminosäuren die größte Domäne des Androgenrezeptors dar. Zu ihren Funktionen wird die Aktivierung und Kontrolle der Transkription gezählt, was unter anderem durch das Aktivierungs-Element (*activation function 1*, AF-1) vermittelt wird (Jenster *et al.*, 1991; Simental *et al.*, 1991). Es bindet allgemeine Transkriptionsfaktoren wie TFIID (Lee *et al.*, 2000), TFIIF (Reid *et al.*, 2002) oder TBP (McEwan und Gustafsson, 1997) und Coregulator-Proteine wie ARA70 (Alen *et al.*, 1999) oder Cofaktoren der p160/SRC-Familie (Berrevoets *et al.*, 1998; Shang *et al.*, 2002).

und ist involviert in die intramolekulare Interaktion mit der Hormonbindedomäne des Androgenrezeptors (Kraus *et al.*, 1995; Ikonen *et al.*, 1997).

Die zentral gelegene DNA-Bindedomäne weist die größte Homologie in der Familie der Steroidhormonrezeptoren auf und beinhaltet die Aminosäuren 559 bis 624 (Schoenmakers *et al.*, 2000). Sie enthält zwei getrennte Zinkfingerstrukturen, die für die Bindung des Androgenrezeptors an spezifische DNA-Sequenzen, den sogenannten Androgen-responsiblen Elementen (*androgen response elements*, ARE), verantwortlich sind (Claessens *et al.*, 2001; Haelens *et al.*, 2003).

Direkt an die DNA-Bindedomäne schließt sich die *hinge*-Region (Scharnier-Region) an, welche die Bindung des ligandengebundenen Rezeptors an die DNA unterstützt (Haelens *et al.*, 2003). Diese Region, bestehend aus den Aminosäuren 625 bis 675, besitzt eine sehr bewegliche Struktur. Die mit der *hinge*-Region und der DNA-Bindedomäne assoziierte Kernlokalisationssequenz (*nuclear localization sequence*, NLS) vermittelt den Transfer des ligandengebundenen Androgenrezeptors vom Zytoplasma in den Zellkern (Zhou *et al.*, 1994b).

Die Hormonbindedomäne mit den Aminosäuren 676 bis 919 ist für die hoch affine, spezifische Ligandenbindung und die Interaktion mit Hitzeschockproteinen verantwortlich, die den Rezeptor solange in einem inaktiven Zustand halten, bis die Hormonbindung erfolgt (Simental *et al.*, 1991).

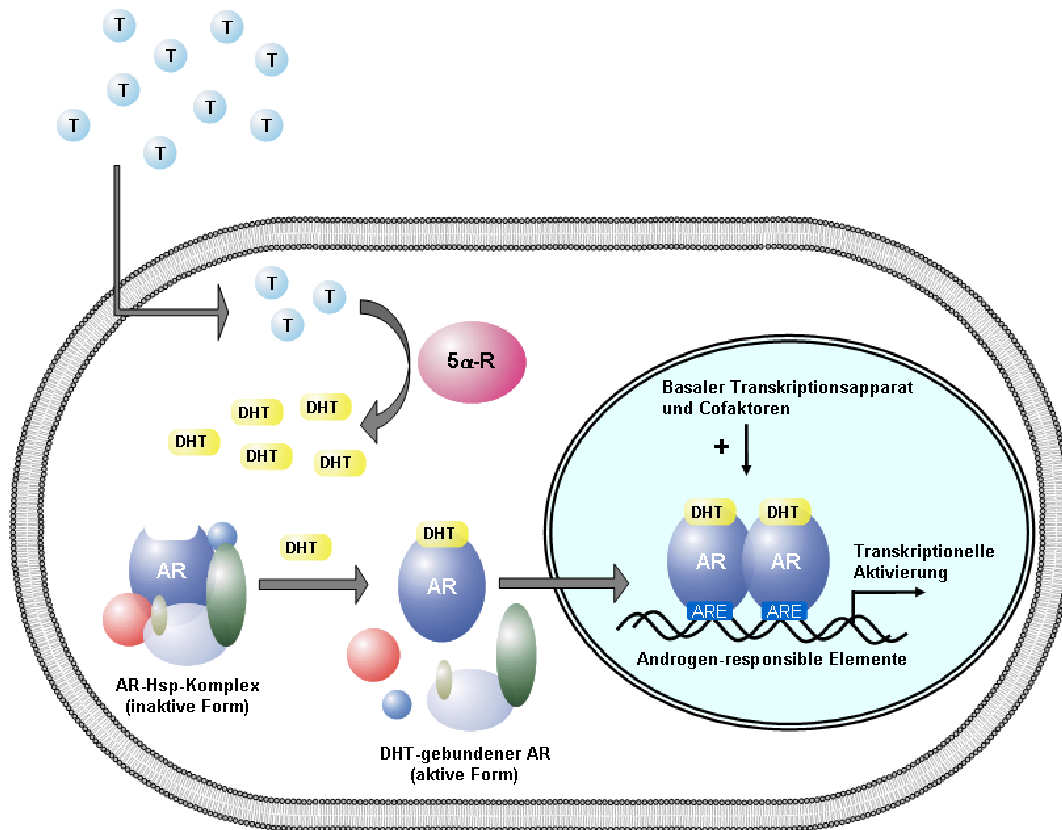
## 1.2 Genomische Wirkungsweise des Androgenrezeptors

In Abwesenheit von Hormon liegt der Androgenrezeptor hauptsächlich im Zytoplasma der Zelle in seiner inaktiven Form als Apoprotein vor und besitzt eine hoch affine Spezifität für Androgene. Dies wird hervorgerufen durch das Hitzeschockprotein 90 (*heat shock protein 90*, Hsp90), welches an der Hormonbindedomäne gebunden ist (Smith und Toft, 1993) und den Androgenrezeptor so in der Konformation verändert, dass der Rezeptor in einem transkriptionell inaktiven Zustand gehalten und gleichzeitig die Androgenbindung ermöglicht wird (Fang *et al.*, 1996; Buchner *et al.*, 1999; Prins *et al.*, 2000). Androgenrezeptormutanten, die um die Hormonbindedomäne verkürzt wurden und weder Hormon noch Hsp90 binden, sind konstitutiv aktiv. An dieser Komplexbildung



sind neben Hsp90 noch weitere Proteine, wie z.B. Hsp70, Hsp56, Hsp40 und p23, beteiligt (Veldscholte *et al.*, 1992b; Roy *et al.*, 2001). Erst die Bindung der Androgene an die Ligandenbindedomäne des Androgenrezeptors führt zu einer Konformationsänderung und zur Dissoziation des Multiproteinkomplexes (Wurtz *et al.*, 1996). Zusätzlich wird der Androgenrezeptor an verschiedenen Stellen phosphoryliert, wie z.B. Ser-16, Ser-81, Ser-94, Ser-308 und Ser-650 (Gioeli *et al.*, 2002). Die Phosphorylierung schützt den Androgenrezeptor vor dem proteolytischen Abbau und stabilisiert die Homodimerisierung (Blok *et al.*, 1998). Anschließend kommt es zur Translokation des ligandengebundenen Rezeptors in den Zellkern, wo er als Homodimer durch zwei Zinkfinger motive in der DNA-Bindedomäne an palindrome DNA-Sequenzen, den sogenannten Androgen-responsiblen Elementen (ARE), bindet (Zhou *et al.*, 1994a; Beato *et al.*, 1996). Diese DNA-Sequenzen befinden sich in Promotor- oder *Enhancer*-Regionen von Androgenrezeptor-induzierbaren Genen, wie z.B. dem Prostata-spezifischen Antigen (*prostate specific antigen*, PSA) (Riegman *et al.*, 1991), Probasin (Rennie *et al.*, 1993) und vielen anderen (Chang *et al.*, 1995).

Die ARE bestehen aus zwei Hexanukleotidsequenzen (5'-AGAACA-3'), sogenannte *inverted repeats*, die spiegelsymmetrisch zueinander angeordnet und durch drei nichtkonservierte Basenpaare getrennt werden (5'-AGAACAnnnTGTTCT-3') (Beato *et al.*, 1995). Diese invertierten Palindrome werden auch durch den Glukokortikoidrezeptor, den Mineralkortikoidrezeptor und den Progesteronrezeptor erkannt. Die Rezeptoren positionieren sich auf diesen DNA-Elementen „Kopf an Kopf“ („*head to head*“) als Homodimere. Zusätzlich ist der Androgenrezeptor als einziger Steroidhormonrezeptor in der Lage, an das hexamerische Bindungsmotiv 5'-AGAACA-3' als direkte Tandem-Wiederholung (Verrijdt *et al.*, 2000) in einer „Kopf zu Schwanz“ („*head to tail*“) Orientierung zu binden (Verrijdt *et al.*, 2003). Durch den DNA-Proteinkomplex aus ARE und Androgenrezeptor wird zusammen mit weiteren Proteinen ein Transkriptionskomplex aufgebaut, der die Transkription des regulierten Zielgenes ermöglicht (Shang *et al.*, 2002) (siehe Abb. 1.2).



**Abb. 1.2: Genomische Wirkungsweise des Androgenrezeptors.** Schematische Darstellung der ligandenabhängigen Genregulation durch den Androgenrezeptor. Testosteron (T) diffundiert als lipophiles Molekül durch die Zellmembran und wird im Zytoplasma der Zielzelle durch das Enzym 5α-Reduktase in das aktivere Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt. In Abwesenheit von Hormon liegt der Androgenrezeptor (AR) im Zytoplasma der Zelle zusammen mit verschiedenen Hitzeschockproteinen (Hsp) in einem Multiproteinkomplex in einer inaktiven Form vor. Kommt es zur Hormonbindung verändert sich die Konformation des Androgenrezeptors, er dissoziiert vom Komplex und befindet sich in seiner aktiven Form. Anschließend findet die Translokation in den Zellkern statt, wo der Rezeptor als Homodimer und im Komplex mit dem basalen Transkriptionsapparat und verschiedenen Cofaktoren an spezifische DNA-Sequenzen, den sogenannten Androgen-responsiblen Elementen (ARE), bindet und die Transkription der Zielgene reguliert.

Neben den Komponenten des basalen Transkriptionsapparates, wie TFIIF (Reid *et al.*, 2002), dem TATA-Box-Bindeprotein (TBP) (McEwan und Gustafsson, 1997), Sequenz-spezifischen Transkriptionsfaktoren (Ning *et al.*, 1999) und der RNA-Polymerase II, spielen Transkriptions-Intermediärfaktoren (*Transcription Intermediary Factors*, TIF), Coaktivatoren und Corepressoren eine wichtige Rolle. Sie kontrollieren die rezeptorvermittelte Transkription durch Aktivierung oder Hemmung der entsprechenden Gene (Tsai und O'Malley,

1994; Quigley *et al.*, 1995). Cofaktoren regulieren die Transkription durch Veränderung der Chromatinstruktur oder durch den Einfluss auf die Rekrutierung der basalen Transkriptionsmaschinerie (Gelman, 2002; Haendler, 2002).

Die p160/SRC-Familie der Cofaktoren, wie TIF2 (*transcriptional intermediary factor 2*) (Berrevoets *et al.*, 1998) oder SRC-1 (*steroid receptor coactivator-1*) (Shang *et al.*, 2002), besitzen Histonacetyltransferase-Aktivität und sind in der Lage, die Histonacetylase CBP/p300 zu rekrutieren, was zu einer Chromatinveränderung in einen transkriptionell aktiven Status führt (Leo und Chen, 2000). Neben der Acetylierung der Chromatinstruktur wird auch der Androgenrezeptor selbst acetyliert (McKenna und O'Malley, 2002). Die Acetylierung der Histone bewirkt eine Entspannung der kompakten Struktur und somit eine verbesserte Transkription. Außerdem wurde die essentielle Rolle der Acetylierung des Androgenrezeptors für dessen Transkriptions-Aktivierungsfunktion gezeigt (Fu *et al.*, 2000). Ein für die Acetylierung notwendiges Motiv mit der Aminosäuresequenz KLKK befindet sich in der *hinge*-Region des Androgenrezeptors. Die Mutation der Aminosäuren Lysin zu Arginin hebt die Acetylierung des Androgenrezeptor-Proteins auf und reduziert die DHT-abhängige Aktivierung verschiedener androgenregulierter Gene, wie PSA oder MMTV (*mouse mammary tumor virus*) (Fu *et al.*, 2000). ARA70 (*androgen receptor association protein 70*) (Alen *et al.*, 1999) und ARA55 (*androgen receptor association protein 55*) (Fujimoto *et al.*, 1999) sind weitere Coaktivatoren des Androgenrezeptors.

Die Bindung dieser Coregulatoren erfolgt sowohl an der Transaktivierungsdomäne AF-1 als auch an AF-2 über das  $\alpha$ -helikale Motiv LXXLL (L=Leucin, X=beliebige Aminosäure) (Le Douarin *et al.*, 1996; Heery *et al.*, 1997). Die AF-2-Domäne im C-terminalen Teil des Androgenrezeptors besitzt nur ein sehr schwaches Transaktivierungspotential, während die AF-1-Domäne im N-terminalen Bereich die hauptsächliche Transaktivierungsfunktion übernimmt (Jenster *et al.*, 1995). Die AF-2-Domäne des Androgenrezeptors weist zusätzlich eine deutliche Präferenz für Phenylalanin-reiche Motive, wie die Sequenz FXXLF, auf (He *et al.*, 2000; He und Wilson, 2003). Solche Motive existieren unter anderem im N-Terminus des Androgenrezeptors als auch in verschiedenen Coaktivatoren, wie z.B. ARA54, ARA55 und ARA70 (He *et al.*,

2000; He und Wilson, 2002; Lee und Chang, 2003). Das sich im N-Terminus des Androgenrezeptors befindende FXXLF-Motiv (Aminosäuren 23-27) vermittelt eine direkte, ligandenabhängige Interaktion des N-Terminus mit der Hormonbindedomäne (N/C-Interaktion) des Androgenrezeptors, erleichtert so die Dimerisierung, stabilisiert die Androgenbindung und reguliert möglicherweise die AF-1 und AF-2 Aktivität (Langley *et al.*, 1998; He *et al.*, 2000).

Die p160-Coaktivatoren erhöhen die Transkription zusätzlich durch Rekrutierung sekundärer Coaktivatoren. Neben der bereits genannten Histonacetylase CBP/p300 werden auch Methyltransferasen, wie CARM1 (*coactivator-associated arginine methyltransferase 1*) und PRMT1 (*protein arginine methyltransferase 1*), rekrutiert. Dabei zeigte sich, dass PRMT1 ebenso wie CARM1 mit der C-terminalen Aktivator-domäne 2 (AD2) von p160-Proteinen interagieren und essentiell für deren Coaktivatorfunktion sind (Koh *et al.*, 2001). Die Methylierung von Arginin in Histon 3 an Position 17 und 26 im Transkriptionsinitiationskomplex durch CARM1 (Schurter *et al.*, 2001) deutet auf eine Kooperation zwischen Methylierung und Protein-Acetylierung durch andere Coaktivatoren zur Veränderung der Chromatinstruktur und auf eine Erhöhung der Aktivität von Steroidhormonrezeptoren hin (Chen *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2001). Zusätzlich konnte für den Androgenrezeptor auch eine Demethylierung beobachtet werden. Die Interaktion mit dem Enzym LSD 1 (*lysine-specific demethylase 1*), das das Histon H3 spezifisch am Lysin an Position 9 demethyliert, führt zur transkriptionellen Aktivierung von Androgenrezeptor-Zielgenen (Metzger *et al.*, 2005).

Neben der Acetylierung und Methylierung gibt es weitere posttranslationale Modifikationen, wie Ubiquitinierung und Sumoylierung, die ebenfalls einen wesentlichen Einfluss auf die Genregulation ausüben (Cheung *et al.*, 2000; Strahl und Allis, 2000). Die Ubiquitinierung ist in die Proteindegradation durch das 26S Proteasom involviert (Jaworski, 2006). Lin und Kollegen postulieren eine Phosphorylierungs-abhängige Androgenrezeptor-Ubiquitinierung und Degradation durch die E3-Ligase-Aktivität von Mdm2 (Lin *et al.*, 2002). Auch wurde der Androgenrezeptor ebenfalls als Substrat für Sumoylierung identifiziert (Poukka *et al.*, 2000; Nishida und Yasuda, 2002). Die Androgenrezeptor-vermittelte Transkription wird in Abhängigkeit von der Expression von SUMO-1 (*small ubiquitin-related modifier*) und der E3-RING-

Finger-ähnlichen Domäne von PIAS1 (*protein inhibitor of activated STAT*) und PIASx $\alpha$  reprimiert (Nishida und Yasuda, 2002). Die Sumoylierung des Androgenrezeptors an der Aminosäure Lysin an Position 385 und 511 (Callewaert *et al.*, 2004) stellt damit eine negative Regulation seiner transkriptionellen Aktivität dar. Andere Proteine aus dem Androgenrezeptor-Transkriptionskomplex, wie GRIP1 (*glucocorticoid receptor interacting protein-1*) (Kotaja *et al.*, 2002) und HDAC1 (*histone deacetylase 1*) (Cheng *et al.*, 2004), werden ebenso durch Sumoylierung bzw. Desumoylierung modifiziert. Neben Coaktivatoren wird die transkriptionelle Aktivität des Androgenrezeptors auch durch Corepressoren reguliert. Corepressoren sind unter anderem NCoR (*nuclear receptor corepressor*) und SMRT (*silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors*), die eine direkte Interaktion mit dem Androgenrezeptor zeigen und die androgenabhängige Transaktivierung des Rezeptors reprimieren (Cheng *et al.*, 2002; Dotzlaw *et al.*, 2002; Liao *et al.*, 2003).

### 1.3 Nicht-genomische Wirkungsweise des Androgenrezeptors

Zusätzlich zur transkriptionellen bzw. genomischen Wirkungsweise können Steroide auch schnelle, nicht-genomische Effekte auslösen. Androgene stellen wichtige Regulatoren in Prostatakrebs dar und sind neben der genomischen Wirkungsweise auch an anderen zellulären Signaltransduktionswegen beteiligt (Cato *et al.*, 2002).

Lange Zeit glaubte man, dass Steroidhormone ihre Wirkung ausschließlich über einen regulatorischen Einfluss auf den Transkriptionsprozess entfalten. Nahezu alle Mitglieder der Steroidhormon-Familie sind jedoch in der Lage, schnelle Effekte zu bewirken (Falkenstein und Wehling, 2000).

Die nicht-genomische Wirkungsvermittlung ist unabhängig von Transkription bzw. Proteinsynthese. Sie wirken stattdessen modulierend über zytosolische oder membrangebundene, regulatorische Proteine. Signalkaskaden, wie beispielsweise der MAPK-Signalweg (*mitogen activated protein kinase*), der PI3-Kinase-Signalweg (*phosphatidylinositol 3-kinase*) oder Tyrosinkinasen, werden über diese nicht-transkriptionellen Mechanismen beeinflusst (Migliaccio *et al.*, 1996; Watters *et al.*, 1997). Auch die Induktion von

konventionellen *second-messenger*-Signaltransduktionskaskaden, wie z.B. die Erhöhung des intrazellulären Calciumlevels ( $\text{Ca}^{2+}$ ) und die Aktivierung der Protein-kinase A (PKA) und Proteinkinase C (PKC), zählen zu schnellen nicht-genomischen Wirkungen (Heinlein und Chang, 2002). Ebenso konnte eine Wirkung dieser Effekte auf Zellmembran-assoziierte Proteine, wie Ionenkanäle (Tesarik und Mendoza, 1995) und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Kelly und Wagner, 1999), nachgewiesen werden. Diese Effekte treten in Sekunden bis Minuten auf und sind zu schnell, um auf Transkription und Proteinsynthese zurückgeführt werden zu können, was jedoch nicht ausschließt, dass nicht-genomische Wirkungsmechanismen im späteren Verlauf auch transkriptionelle Effekte zur Folge haben. Man geht davon aus, dass eine vollständige Hormonwirkung sogar oftmals erst durch den nicht-genomischen Mechanismus komplettiert wird (Wehling *et al.*, 1997).

Aufgrund ihres Wirkmechanismus kann man die nicht-genomische Wirkungsvermittlung von Steroiden einteilen in: (I) direkte Steroideffekte, die an der Plasmamembran auftreten, aber nicht über einen Rezeptor vermittelt werden; (II) Effekte, die über einen membrangebundenen Rezeptor ausgelöst werden, der aber nicht dem klassischen Steroidhormonrezeptor entspricht und (III) Effekte, die über einen an der Membran lokalisierten klassischen Steroidrezeptor vermittelt werden (Cato *et al.*, 2002).

Hydrophobe Steroide sind in der Lage, mit dem polaren Kopf von Membranphospholipiden zu interagieren (Duval *et al.*, 1983). Die Anreicherung von Steroiden in der Membran hat möglicherweise Einfluss auf die zelluläre Adhäsion und Zell-Zell-Interaktionen und verändert die Funktion von Ionenkanälen in der Membran. Es wurde beobachtet, dass sowohl Östrogen als auch Progesteron und DHT die Membranfluidität in Zellen verändern können, die nicht den klassischen Steroidrezeptor dieser Hormone besitzen, allerdings in den meisten Fällen nur in extrem hohen Konzentrationen (Clarke *et al.*, 1990, Whiting *et al.*, 2000).

Weiterhin scheint es eine nicht-genomische Steroidvermittlung auch über membranständige Rezeptoren zu geben, die sich von den klassischen Steroidrezeptoren strukturell unterscheiden (Falkenstein *et al.*, 2000). Dabei handelt es sich hauptsächlich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Kennzeichnend für solche Membranrezeptoreffekte ist die Tatsache, dass sie nicht durch die

klassischen Antagonisten der Steroidhormonrezeptoren blockiert werden können. Ein Beispiel für einen solchen Mechanismus ist die Aktivierung der Phospholipase C in Osteoblasten durch die Interaktion des Östrogenrezeptors mit einem G-Protein. Durch diese Bindung werden IP<sub>3</sub> (Inositol-Triphosphat) und DAG (Diacylglycerol) gebildet und es kommt zu einer Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung aus Speichern des Endoplasmatischen Retikulums, was einen schnellen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration zur Folge hat (Le Mellay *et al.*, 1997). Auch beim Androgenrezeptor konnte ein derartiger Mechanismus nachgewiesen werden, z.B. in männlichen Ratten-Osteoblasten (Lieberherr und Grosse, 1994) oder aktivierten T-Zellen (Benten *et al.*, 1997). Ein weiteres Beispiel ist die Makrophagen-Zelllinie IC-21, welche keinen klassischen Androgenrezeptor exprimiert. Hier konnte ebenfalls eine schnelle androgenvermittelte Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration gezeigt werden (Benten *et al.*, 1999b). Diese Effekte konnten durch die Antagonisten Hydroxyflutamid und Cyproteronazetat nicht gehemmt werden.

Im Gegensatz dazu konnten in der humanen Prostatazelllinie LNCaP (Steinsapir *et al.*, 1991) schnelle androgenvermittelte Steigerungen der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Hydroxyflutamid blockiert werden. Hier scheinen also membranständige Androgenrezeptoren beteiligt zu sein, die eine strukturelle Ähnlichkeit mit Hormonrezeptoren besitzen oder sogar mit ihnen identisch sind. Mit Hilfe eines Membran-impermeablen, Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Testosteron-BSA-Konjugates (Te-BSA-FITC-Konjugat) konnten spezifische Bindungsstellen für Testosteron an der Zellmembran detektiert werden, die als membranständige Androgenrezeptoren bezeichnet werden (Benten *et al.*, 1997, 1999a und 1999b; Guo *et al.*, 2002).

Zu den durch Steroide regulierten Signalwegen gehören unter anderem die MAPK-Kaskade sowie einige Tyrosin- und Lipidkinasen. Sowohl der Androgenrezeptor als auch der Progesteron- und der Östrogenrezeptor sind in der Lage, unabhängig von der transkriptionellen Wirkung, die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 (*extracellular signal-related kinase 1/2*) zu aktivieren (Peterziel *et al.*, 1999; Migliaccio *et al.*, 2000; Boonyaratanakornkit *et al.*, 2001; Kousteni *et al.*, 2001).

In der Prostatakrebszelllinie LNCaP erfolgt die Stimulierung der Src-Kinase durch 10 nM des synthetischen Androgens R1881 innerhalb einer Minute

(Migliaccio *et al.*, 2000). Die Schnelligkeit der Aktivierung des Src/Raf/ERK-Signalweges deutet auf einen nicht-genomischen Mechanismus hin und ist abhängig von der Anwesenheit des Androgenrezeptors. Dies haben Experimente in Androgenrezeptor-negativen COS-1 Zellen gezeigt, wo die Transfektion des Androgenrezeptors notwendig ist, um die MAPK-Kaskade durch R1881 zu aktivieren (Migliaccio *et al.*, 2000). Während die Interaktion mit dem Androgenrezeptor über die prolinreiche Region an der SH3-Domäne (*src homology 3*) von Src zustande kommt, bindet der Östrogenrezeptor über einen phosphorylierten Tyrosinrest an die SH2-Domäne (*src homology 2*) der Tyrosin-Kinase (Migliaccio *et al.*, 2000).

Weiterhin konnte auch eine Aktivierung der PI3-Kinase durch Androgene in androgensensitiven Epithelzellen gezeigt werden (Baron *et al.*, 2004). Die PI3-Kinase-Aktivierung resultiert in der Phosphorylierung der Proteinkinase B und wird durch die Interaktion zwischen Androgenrezeptor und der p85 $\alpha$ -Untereinheit ermöglicht. Die Bindung wird über die N-terminal gelegene SH3-Domäne und die sich im C-Terminus befindende C-SH2-Domäne realisiert. Zusätzlich zeigte die durch Androgen vermittelte Aktivierung des PI3-Kinase/PKB-Signalweges einen anti-apoptotischen Effekt in Epithelzellen (Baron *et al.*, 2004).

### **1.4 Ligandenunabhängige Wirkungsweise des Androgenrezeptors**

Zusätzlich zum ligandenabhängigen Wirkungsmechanismus des Androgenrezeptors konnte auch eine in Abwesenheit von Androgenen erfolgte Wirkung als Transkriptionsfaktor beobachtet werden. Als erstes konnten Culig und Kollegen zeigen, dass in Abwesenheit von Hormon in DU145 Zellen Wachstumsfaktoren, wie EGF, IGF-I und KGF, den Androgenrezeptor aktivieren, was später durch weitere Studien bestätigt wurde (Culig *et al.*, 1994; Hobisch *et al.*, 1998; Di Lorenzo *et al.*, 2002; Krückl *et al.*, 2004; Bartlett *et al.*, 2005). Diese Faktoren können entweder die androgenunabhängige Aktivierung des Androgenrezeptors induzieren oder den Androgenrezeptor für geringe Androgen-Konzentrationen sensibilisieren (Culig *et al.*, 1994; Ueda *et al.*, 2002a; Gregory *et al.*, 2004). Die transkriptionelle Aktivität und Sensibilisierung



wird über Tyrosin-Kinase-Rezeptoren und ihre *downstream* gelegenen Effektoren sehr stark durch posttranslationale Modifikationen, wie die Phosphorylierung des Androgenrezeptors und seiner Coregulatoren, reguliert. Die Transaktivierung des Androgenrezeptors hängt wesentlich von seinem Phosphorylierungsstatus ab, wobei die exakte physiologische Rolle der Phosphorylierung des Androgenrezeptors noch nicht vollständig geklärt ist. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass unterschiedliche Kinase-Kaskaden, wie z.B. der MAP-Kinase- und der PI3-Kinase-Signalweg oder die Protein-Kinase A (PKA) und Protein-Kinase C (PKC), involviert sind. Diese Signaltransduktionskaskaden beeinflussen den Androgenrezeptor durch direkte Serin/Threonin-Phosphorylierung oder durch Phosphorylierung rezeptor-relevanter Coaktivatoren wie TIF2 oder SRC-1 (Yeh *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2001; Gregory *et al.*, 2004). Erst kürzlich veröffentlichte Studien demonstrieren auch eine Regulation des Androgenrezeptors durch Tyrosin-Phosphorylierung (Guo *et al.*, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Tyrosin-Phosphorylierung in hormonrefraktären Prostatakarzinomen vorliegt, was darauf hindeutet, dass Prostatakrebszellen auf Wachstumsfaktoren und Zytokine zurückgreifen, um die Wirkung der fehlenden Androgene zu kompensieren. Inzwischen ist eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Neuropeptiden bekannt, die durch unterschiedlichste Signaltransduktionswege den Androgenrezeptor und Androgenrezeptor-assoziierte Proteine durch Phosphorylierung ligandenunabhängig regulieren können. In Tab. 1.1 sind die wesentlichsten Wachstumsfaktoren und Zytokine mit dem jeweils vermittelnden Signaltransduktionsweg und der funktionellen Konsequenz für den Androgenrezeptor aufgelistet. Dabei stellt der PI3-Kinase-Signalweg einen der wichtigsten Signalübertragungswege, über den Wachstumsfaktoren die Androgenrezeptorwirkung beeinflussen, dar und wird im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

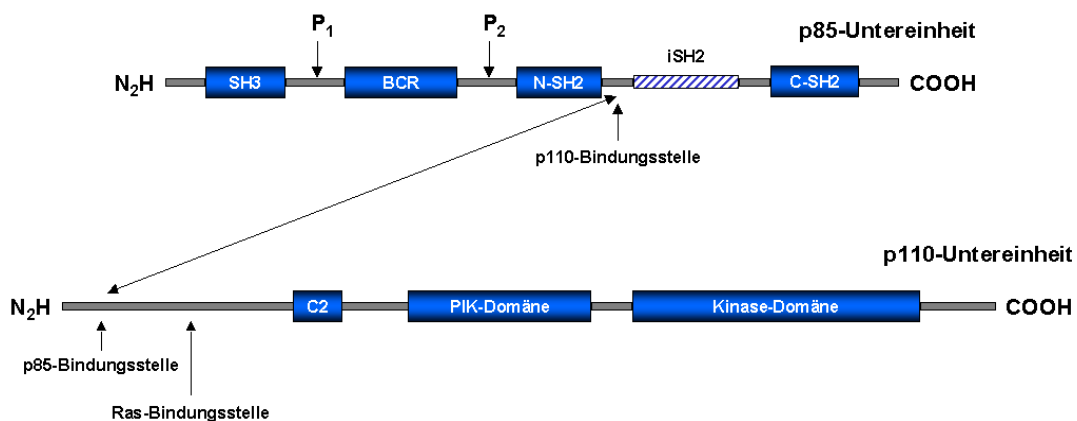
**Tab. 1.1: Regulation des Androgenrezeptors durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und Neuropeptide.** Aufgelistet sind die Wachstumsfaktoren und Zytokine mit ihrem jeweils vermittelnden Signaltransduktionsweg und dem daraus resultierenden Effekt auf den Androgenrezeptor und seine Cofaktoren mit der funktionellen Konsequenz. Zusätzlich sind die entsprechenden Referenzen angegeben.

Wachstumsfaktoren/ Zytokine	vermittelnder Signaltransduktionsweg	Effekt auf Androgen- rezeptor / Cofaktoren	funktionelle Konsequenz	Referenzen
IGF-I	PI3K/PKB-Signalweg	Phosphorylierung Ser-213/ Ser-791	Rezeptor- Degradation	Lin <i>et al.</i> , 2001; Lin <i>et al.</i> , 2002
IGF-I	nicht bekannt	nicht bekannt	Transaktivierung	Culig <i>et al.</i> , 1994
KGF	nicht bekannt	nicht bekannt	Transaktivierung	Culig <i>et al.</i> , 1994
EGF	MAPK-Signalweg	Tyrosin- Phosphorylierung Tyr-534	Transaktivierung	Guo <i>et al.</i> , 2006
EGF	MAPK-Signalweg	Phosphorylierung der Coaktivatoren TIF2/GRIP1	Transaktivierung	Gregory <i>et al.</i> , 2004
EGF	MAPK-Signalweg	Phosphorylierung Ser-515	Transaktivierung	Yeh <i>et al.</i> , 1999
HER2/Neu	MAPK-Signalweg	Androgenrezeptor- ARA70 Interaktion	Transaktivierung	Yeh <i>et al.</i> , 1999
HER2/Neu	PI3K/PKB-Signalweg	Phosphorylierung Ser-213/Ser-791	Transaktivierung	Wen <i>et al.</i> , 2000
HER2/ERB3	PI3K/PKB-Signalweg	Stabilisierung des AR- Proteins, DNA-Bindung	Transaktivierung	Mellinghoff <i>et al.</i> , 2004
IL-6	STAT3-Signalweg	Phosphorylierung	Transaktivierung	Chen <i>et al.</i> , 2000; Yang <i>et al.</i> , 2003
IL-6	MAPK-Signalweg	Phosphorylierung	Transaktivierung	Yang <i>et al.</i> , 2003
IL-6	MAPK-Signalweg	p300	Transaktivierung	Debes <i>et al.</i> , 2002
IL-6	MAPK-Signalweg	Phosphorylierung von SRC-1	Transaktivierung	Ueda <i>et al.</i> , 2002b
IL-6	PI3K/PKB-Signalweg	nicht bekannt	Reprimierung	Yang <i>et al.</i> , 2003
Forskolin	Proteinkinase A	Erhöhung von cAMP	Transaktivierung	Nazareth und Weigel, 1996; Grossmann <i>et al.</i> , 2001
cdk1 (cyclin dependent kinase 1)	nicht bekannt	Phosphorylierung Ser-81	AR-Expression und Stabilisierung	Chen <i>et al.</i> , 2006
Bombesin	Src-Signalweg	nicht bekannt	Transaktivierung	Desai <i>et al.</i> , 2006

## 1.5 Phosphatidylinositol-3-Kinase-Signaltransduktion

Die Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3-Kinasen) sind eine Enzymfamilie, die sowohl Protein- als auch Lipidkinaseaktivitäten zeigen und eine wichtige Rolle in vielen Signaltransduktionswegen von zellulären Prozessen, wie z.B. Zellwachstum und Zelldifferenzierung, Apoptose oder Zelladhäsion, spielen (Shepherd *et al.*, 1998). Die Familie der PI3-Kinasen beinhaltet mehrere Enzyme mit unterschiedlicher Lipidsubstrat-Spezifität, unterschiedlicher Größe der katalytischen und regulatorischen Untereinheiten sowie differierenden Aktivierungsmechanismen (Vanhaesebroeck *et al.*, 1997; Krugmann und Welch, 1998). Von den drei Klassen soll in dieser Arbeit näher auf die Ia-p85/p110-PI3-Kinase eingegangen werden.

Die PI3-Kinase ist ein Heterodimer, bestehend aus einer 85 kDa großen regulatorischen Untereinheit und einer 110 kDa großen katalytischen Untereinheit. In nicht stimulierten Zellen befindet sich der inaktive p85/p110-Komplex im Zytoplasma (Wymann und Pirola, 1998). Die p85-Untereinheit besteht aus einer SH3-Domäne (*src homology 3*), zwei prolinreichen Regionen, einer BCR (*breakpoint cluster region*), zwei SH2-Domänen (*src homology 2*) (N-SH2 und C-SH2) und einer iSH2-Region (*inter-SH2 region*) (siehe Abb. 1.3). Diese Domänen erlauben es der p85-Untereinheit mit anderen Proteinen zu interagieren und auf diese Weise als Adaptormolekül für die katalytische p110-Untereinheit zu dienen.



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der p85 $\alpha$ - und p110 $\alpha$ -Untereinheiten der Phosphatidylinositol-3-Kinase.** Die p85 $\alpha$ -Untereinheit besteht aus einer SH3-

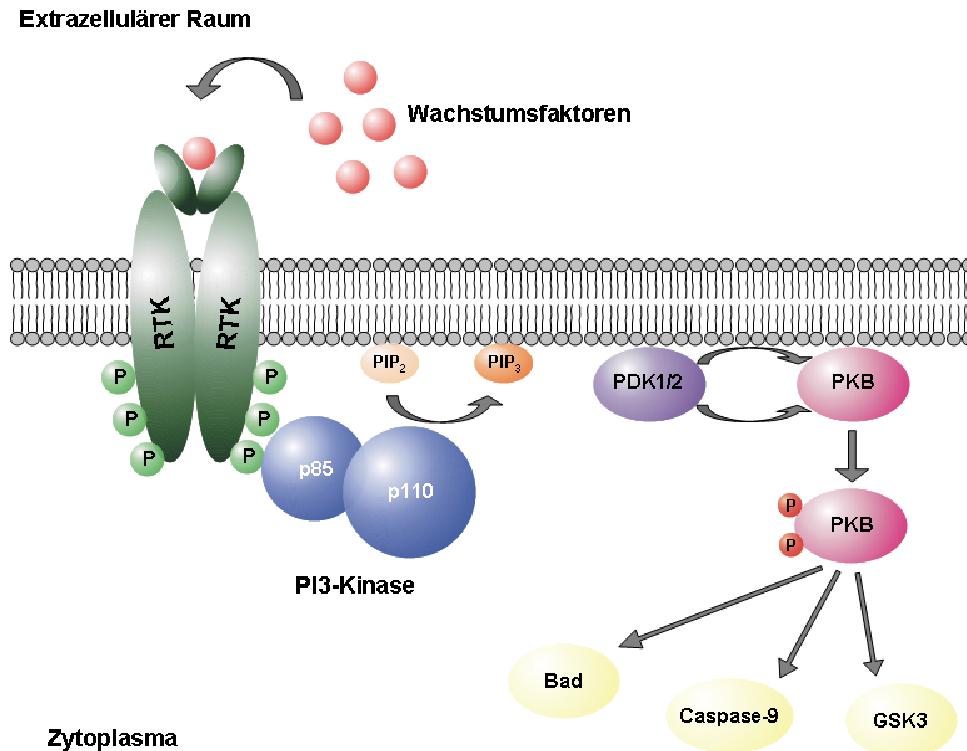
Domäne (*src homology 3 domain*), zwei prolinreichen Regionen P<sub>1</sub> und P<sub>2</sub>, einer BCR-Domäne (*breakpoint cluster region*), einer N-SH2 und einer C-SH2-Domäne (*src homology 2 domain*) sowie einer iSH2-Domäne (*inter-SH2 region*). Die p110-Untereinheit ist durch eine p85- und eine Ras-Bindungsstelle sowie eine C2-Domäne, eine PIK-Domäne (*phosphoinositide kinase*) und eine Kinase-Domäne gekennzeichnet. Modifiziert nach Wymann und Pirola, 1998.

Die p110-Untereinheit besteht aus einer Lipid- und einer autoregulatorisch wirkenden Ser/Thr-Proteinkinase-Domäne, einer C2-Domäne sowie einer p85- und einer Ras-Bindungsstelle (Wymann und Pirola, 1998). Die am höchsten konservierte Region bei allen PI3-Kinase-Klassen ist die C-terminal gelegene Kinase-Domäne. Sie weist Strukturmerkmale auf, wie z.B. hoch konservierte Aminosäuren, die für die Koordination des ATP-Moleküls verantwortlich sind. Ein für alle Lipidkinasen typisches Strukturmotiv ist die sogenannte PIK-Domäne (*phosphoinositide kinase*) deren detaillierte Funktion bis jetzt noch nicht geklärt werden konnte. Die Deletion dieser Domäne führt jedoch zum Verlust der Lipidkinase-Aktivität (Molendijk und Irvine, 1998). Eine weitere konservierte Region ist die im N-Terminus gelegene C2-Domäne, die wahrscheinlich für die Bindungsfähigkeit der Enzyme an Phospholipid-Membranen sorgt (MacDougall *et al.*, 1995; Misawa *et al.*, 1998).

Die PI3-Kinase wird durch verschiedene Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie den IGF-I oder EGF-Rezeptor, aber auch durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR's), wie  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren, die als Signaltransduktoren dienen, um ein extrazelluläres in ein intrazelluläres Signal umzusetzen, aktiviert (Carter *et al.*, 1992; Xiao *et al.*, 2001).

Die Stimulierung der Rezeptor-Tyrosinkinasen durch Wachstumsfaktoren und die anschließende Trans-Autophosphorylierung von Tyrosinresten induziert die Bindung der regulatorischen p85-Untereinheit mit ihrer SH2-Domäne an die Phosphotyrosinreste der Rezeptor-Tyrosinkinasen über ein Y(P)XXM-Motiv (Nolte *et al.*, 1996; Breeze *et al.*, 1996) (siehe Abb. 1.4). Dabei steht Y(P) für einen phosphorylierten Tyrosinrest und X für eine beliebige Aminosäure. Diese Protein-Protein-Interaktion führt zur Aktivierung des PI3-Kinase-Holoenzym, das sich nun in der Nähe der Lipidsubstrate der Plasmamembran befindet (Klippel *et al.*, 1996). Nachfolgend phosphoryliert die PI3-Kinase Inositol-enhaltende Phospholipide an der C3-Position des Inositolringes, sodass aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) Phosphatidylinositol-3,4,5-triphos-

phat (PIP<sub>3</sub>) entsteht. Die Folge der PIP<sub>3</sub>-Konzentrationserhöhung in der Zellmembran ist die Translokation der Proteinkinase B (PKB), auch als Akt bezeichnet, an die Zytoplasmamembran, wo sie durch Phosphorylierung zellulärer Substrate die Signale weiterleitet. Mittels ihrer PH-Domäne (*pleckstrin homology*) interagiert die Proteinkinase B mit PIP<sub>3</sub> an der Plasmamembran, wo sie durch einen Serin-Rest in der regulatorischen Domäne (Ser-473) und einen Threonin-Rest in der katalytischen Domäne (Thr-308) phosphoryliert und aktiviert wird (Coffer *et al.*, 1998; Datta *et al.*, 1999). In diesem Schritt wird das Threonin durch die sogenannte Serin-/Threonin-Kinase PDK1 (*phosphatidylinositol-(3,4,5)-phosphate dependent kinase 1*) katalysiert (Alessi *et al.*, 1996). Für eine maximale Aktivierung der Proteinkinase B muss zusätzlich Ser-473 phosphoryliert sein, was durch PDK1 alleine nicht erfolgt. Die dafür verantwortliche Kinase wird häufig als PDK2 bezeichnet, ist aber noch nicht sicher identifiziert (Kops und Burgering, 1999; Hresko *et al.*, 2003). Die Proteinkinase B reguliert ihrerseits weitere Proteine, wie z.B. die Phosphorylierung und Inaktivierung der Kinase Bad (*Bcl-2 antagonist causing cell death*) und der Caspase-9, die an der Induktion der Apoptose beteiligt sind (Franke und Cantley, 1997). Weiterhin wird auch GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*), welche den Glucosetransport und die Glykogensynthese regelt, durch die Proteinkinase B beeinflusst. Die Substrate der Proteinkinase B besitzen als minimale Konsensussequenz ein RXRXXS/T-Motiv (R=Arginin, S=Serin, T=Threonin und X=beliebige Aminosäure) (Alessi *et al.*, 1996). Die Proteinkinase B ist damit hauptsächlich in proliferative, den Zellzyklus aktivierende (Liang und Slingerland, 2003) oder anti-apoptotische (Datta *et al.*, 1999) Signalwege involviert.



**Abb. 1.4: Aktivierung des PI3-Kinase/PKB-Signalweges durch Wachstumsfaktoren.** Spezifische Wachstumsfaktoren wirken über Rezeptor-Tyrosinkinasen aktivierend auf die PI3-Kinase. Nach der Translokation an den Rezeptor phosphoryliert die PI3-Kinase die in der Plasmamembran befindlichen Phosphatidylinosite an der 3'-Position des Inositolringes. Vornehmlich entsteht dabei PIP<sub>3</sub>, was wiederum für andere Proteine, wie die Proteinkinase B (PKB) und PDK1/2 (*phosphatidylinositol-(3,4,5)-phosphate dependent kinase 1/2*), notwendig ist, welche dadurch mit ihren PH-Domänen (*pleckstrin homology*) an die Zellmembran binden und so in unmittelbare Nähe zueinander gelangen. PDK1 phosphoryliert die Proteinkinase B an Thr-308 und PDK2 an Ser-473, wodurch die Proteinkinase B aktiviert wird und ihrerseits weitere Moleküle phosphoryliert. Zu den Substraten der Proteinkinase B gehören unter anderem Bad (*Bcl-2 antagonist causing cell death*), Caspase-9 oder GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*).

## 1.6 Ursachen für die Entwicklung hormonrefraktärer Prostatakarzinome

Da Entwicklung, Wachstum und Differenzierung der Prostata sowie das Wachstum von primären Prostatatumoren androgenabhängig ist, wird der Androgenentzug und die Antiandrogentherapie als erfolgreiche therapeutische Möglichkeit zur Behandlung der meisten Prostatakarzinome eingesetzt. Trotz der Ausgangserfolge der Behandlungsmethode kommt es nach durchschnittlich

zwei Jahren zu einer erneuten Tumorprogression (Ripple *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2003). Etwa 25 % der Patienten zeigen bereits primär kein Ansprechen auf die Hormontherapie (Konety und Getzenberg, 1997). Eine Involvierung des Androgenrezeptor-Signaltransduktionsweges durch alternative Möglichkeiten der Androgenrezeptoraktivierung ist naheliegend, da auch hormonunabhängig wachsende Prostatatumore das Rezeptorprotein exprimieren (Chen *et al.*, 2004). Es zeigte sich, dass für die Entwicklung einer Resistenz gegenüber der Hormontherapie oft die Amplifikation des Androgenrezeptors verantwortlich ist (Visakorpi *et al.*, 1995; Koivisto *et al.*, 1997; Kaltz-Wittmer *et al.*, 2000). Durch die Genamplifikation kommt es zu einer bis zu sechsfach höheren Expression des Androgenrezeptor-Gens (Linja *et al.*, 2001). Aber auch somatische Mutationen im Androgenrezeptor-Gen kommen für eine Resistenzentwicklung in Frage. Mutationen im Androgenrezeptor wurden bei metastasierenden oder hormonrefraktären, seltener bei primären Prostatakarzinomen beschrieben. Es konnte in einer Vielzahl von Studien festgestellt werden, dass verschiedene Steroidhormone aber auch Nicht-Steroide wie Hydroxyflutamid (Buchanan *et al.*, 2001) eine höhere Affinität zu mutierten Androgenrezeptoren aufweisen, dadurch zu einer höheren transkriptionellen Aktivität führen und so die zelluläre Proliferation stimulieren (Newmark *et al.*, 1992; Culig *et al.*, 1993; Tilley *et al.*, 1996; Marcelli *et al.*, 2000). Anhand der Mutation von Threonin zu Alanin an der Aminosäureposition 877, die in der Prostatazelllinie LNCaP identifiziert wurde, konnte gezeigt werden, dass der mutierte Androgenrezeptor verschiedene Steroidhormone binden kann und eine erhöhte transkriptionelle Aktivierung zeigt (Veldscholte *et al.*, 1992a; Tan *et al.*, 1997). Ebenso können auch in ihrer Aktivierung veränderte Coregulatoren des Androgenrezeptors zu einem Prostatawachstum, auch bei niedrigen Androgenkonzentrationen, führen. So konnte eine erhöhte Expression der Coaktivatoren TIF2 und SRC-1 beobachtet werden, was wiederum zu einer verstärkten Transaktivierung des Androgenrezeptors führte (Gregory *et al.*, 2001). Nakayama und Kollegen konnten im Promotor des Androgenrezeptor-Gens eine Hypermethylierung der CpG-Inseln in einem Teil der Prostatakarzinome feststellen. Der Androgenrezeptor-Promotor war bei 29 % der Patienten mit hormonrefraktären Prostatakarzinomen methyliert. Dagegen zeigte das Prostatagewebe von Patienten mit

primären Karzinomen in nur 10 % der Fälle eine Hypermethylierung (Nakayama *et al.*, 2000).

Eine weitere Theorie besteht darin, dass eine Subpopulation androgen-unabhängiger Prostatazellen bereits vor der Hormontherapie vorhanden ist. Das Prostataepithel entwickelt sich aus einer Stammzellpopulation, die sich unabhängig von Androgenen permanent unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren teilt und aus der sich die Basalzellen bilden (Bonkhoff und Remberger, 1996). Durch die Hormontherapie würden alle androgenabhängigen Zellen sterben und nur die Stammzellen wären in der Lage zu proliferieren (Isaacs, 1999).

Eine weitere Möglichkeit des androgenunabhängigen Wachstums von Prostata-tumoren ergibt sich aus der Aktivierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die wiederum über den PI3-Kinase- oder den MAP-Kinase-Signalweg zur Phosphorylierung des Androgenrezeptors führen. Der Androgenrezeptor wird in diesem Mechanismus unabhängig von seinen natürlichen Liganden aktiviert (Culig *et al.*, 1994; Graff *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Wachstumsfaktoren, wie IGF-I, EGF und KGF, in Abwesenheit von Androgen den Androgenrezeptor aktivieren (Culig *et al.*, 1994). Vor allem die Wirkungsweise der Wachstumsfaktoren und Zytokine spielen in der Entwicklung vom androgenabhängigen zum hormonrefraktären Prostatakarzinom eine immer größere Rolle.



## 2 Zielsetzung

Die Gründe für die Entwicklung eines hormonrefraktären Prostatakarzinoms sind vielfältig. Die erhöhte Konzentration von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren gehört zu den am häufigsten berichteten Veränderungen, die mit der Progression des Prostatakarzinoms von einem lokalen, androgen-abhängigen zu einem metastasierenden, androgenunabhängigen Prostatakrebswachstum einhergehen. Verschiedene Studien zeigen, dass der Androgenrezeptor auch im fortgeschrittenen Prostatakarzinom vorhanden ist und durch Wachstumsfaktoren reguliert werden kann. Aufgrund der Beobachtungen soll im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von IGF-I und weiteren Wachstumsfaktoren auf den Androgenrezeptor und seine Aktivierung untersucht werden. Die Rolle der Androgene und ein möglicher *cross-talk* zwischen Wachstumsfaktor- und Androgen-Signaltransduktion werden dabei ebenfalls berücksichtigt.



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden in p.A.-Qualität von den Firmen Roth (*Karlsruhe*), Merck (*Darmstadt*), Sigma-Aldrich (*Taufkirchen*) und Roche Diagnostics (*Mannheim*) bezogen.

Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agarose	PeqLab, Erlangen
Ampicillin-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Bacto-Agar	Nordwald, Hamburg
Bradford-Lösung	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA, Fraktion V (Rinderserum-Albumin)	PAA Laboratories, Cölbe
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coelenterazin	Biosynth AG, Staad, Schweiz
Deoxy-Nukleosid-triphosphat (dNTP)	Invitrogen, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
DNA-Längenstandard	PeqLab, Erlangen
ECL ( <i>Western Blotting Detection Reagents</i> )	Amersham Biosciences, Freiburg
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Promega, Mannheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid, deionisiert	Roth, Karlsruhe
Glucose	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Roth, Karlsruhe

## Material und Methoden

---

Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycylglycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glutathione Sepharose™ 4B	Amersham Biosciences, Freiburg
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Lactacystin	Calbiochem, Darmstadt
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Linear Acrylamid	Ambion, Darmstadt
Luziferin	Roche Diagnostics, Mannheim
Lysozym	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Morpholinpropansulfonsäure (MOPS)	Roth, Karlsruhe
Natriumazetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
N, N, N,`N`-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Nonidet P-40 (NP40)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Passive Lysis Buffer, 5x</i>	Promega, Mannheim
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonyl-Fluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<i>Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC)</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein-Längenstandard	PeqLab, Erlangen
Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypton	Roth, Karlsruhe

Tris base	Roth, Karlsruhe
Triton-X 100	Roth, Karlsruhe
Tween®-20	Roth, Karlsruhe
UO126 (MEK1/2 Inhibitor)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Wortmannin (PI3-Kinase Inhibitor)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### 3.1.2 Zellkulturchemikalien, Wachstumsfaktoren und Zytokine

#### Zellkulturchemikalien

CCS ( <i>Charcoal/Dextran treated FBS</i> )	Perbio, Bonn
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Taufkirchen
DMEM ( <i>Dulbecco´s Modified Eagle Medium</i> )	Invitrogen, Karlsruhe
FBS ( <i>Foetale Bovine Serum</i> )	PAA Laboratories, Cölbe
Geneticin-Sulfat (G-418)	PAA Laboratories, Cölbe
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640 ( <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640 ohne Phenolrot	Invitrogen, Karlsruhe
PBS ( <i>Phosphate-Buffered Saline</i> )	Invitrogen, Karlsruhe

#### Wachstumsfaktoren und Zytokine

EGF ( <i>Epidermal Growth Factor</i> )	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IGF-I ( <i>Insulin-like Growth Factor-I</i> )	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
IL-6 (Interleukin-6)	PeproTech, London, UK

### 3.1.3 Radiochemikalien

L-[ <sup>35</sup> S]-Methionin	37 MBq/ml
[ <sup>14</sup> C]-methylierte Proteine als Molekulargewichts-Standard	185 kBq/ml

Alle Radiochemikalien wurden von den Firmen Amersham Biosciences (*Freiburg*) und PerkinElmer (*Rodgau-Jügesheim*) bezogen.

### 3.1.4 Transfektionsreagenzien

<i>FuGENE<sup>®</sup> 6 Transfection Reagent</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>HiPerFect Transfection Reagent</i>	Qiagen, Hilden

### 3.1.5 Membranen und Filme

Immobilon <sup>™</sup> P-Transfer Membran	Millipore, Schwalbach
Hyperfilme <sup>™</sup> ECL ( <i>High performance chemiluminescence film</i> )	Amersham Biosciences, Freiburg
Hyperfilme <sup>™</sup> MP ( <i>High performance autoradiography film</i> )	Amersham Biosciences, Freiburg

### 3.1.6 Kits

Wizard <sup>®</sup> <i>Plus</i> SV Minipreps DNA Purification System	Promega, Mannheim
QIAGEN <sup>®</sup> Plasmid Purification Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick <sup>™</sup> Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
NucleoSpin <sup>®</sup> RNA II	Macherey-Nagel, Düren
TNT <sup>®</sup> T7 Quick Coupled Transcription/Translation System	Promega, Mannheim
QuikChange <sup>®</sup> II Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, CA
QuantiTect <sup>®</sup> SYBR <sup>®</sup> Green PCR Kit	Qiagen, Hilden

### 3.1.7 Enzyme

#### Restriktionsenzyme

Alle Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Promega (*Mannheim*), Roche Diagnostics (*Mannheim*) und Invitrogen (*Karlsruhe*) bezogen.

modifizierende Enzyme

Adventage™KlenTaq Polymerase Mix	Clontech, Heidelberg
PfuUltra™High-Fidelity DNA Polymerase	Stratagene, La Jolla, CA
Shrimp Alkaline Phosphatase	Promega, Mannheim
T4 DNA-Ligase	Promega, Mannheim
T4 DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
Taq-Polymerase	Promega, Mannheim
M-MLV-RT	
(Moloney-Murine Leukemia Virus-Reverse Transcriptase)	
	Promega, Mannheim

**3.1.8 Androgene**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Androgene Testosteron und Dihydrotestosteron (DHT) von der Firma Sigma-Aldrich (*Taufkirchen*) verwendet.

**3.1.9 Antikörper**

3.1.9.1 Primäre Antikörper

**anti-AR F39.4.1**

(*BioGenex, Hamburg*)

Monoklonaler (Maus-) Antikörper gegen die Aminosäuren 301 - 320 des humanen Androgenrezeptors

**anti-AR (c-19)**

(*Santa Cruz, Heidelberg*)

Polyklonaler (Kaninchen-) Antikörper gegen die letzten 19 Aminosäuren des humanen Androgenrezeptors

**anti-AR44**

(*Eurogentec, Köln*)

Polyklonaler (Kaninchen-) Antikörper gegen die Aminosäuren 201 - 222 des humanen Androgenrezeptors

**anti-Akt**

(*New England Biolabs, Frankfurt am Main*)

Polyklonaler (Kaninchen-) Antikörper gegen endogenes Akt1, Akt2 und Akt3

**anti-phospho-Akt (Ser473) (193H12)**

(*New England Biolabs, Frankfurt am Main*)

Monoklonaler (Kaninchen-) Antikörper gegen endogenes Akt mit phosphoryliertem Serin an Position 473

**anti-phospho-Akt (Thr308) (244F9)**

(*New England Biolabs, Frankfurt am Main*)

Monoklonaler (Kaninchen-) Antikörper gegen endogenes Akt mit phosphoryliertem Threonin an Position 308

**anti-ERK 2 (D-2)**

(*Santa Cruz, Heidelberg*)

Monoklonaler (Maus-) Antikörper gegen den C-Terminus von ERK 2

**anti-phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204)**

(*New England Biolabs, Frankfurt am Main*)

Polyklonaler (Kaninchen-) Antikörper gegen ERK 1 und ERK 2 mit phosphoryliertem Threonin an Position 202 und phosphoryliertem Tyrosin an Position 204

**anti-GST**

(*Sigma-Aldrich, Taufkirchen*)

Monoklonaler Antikörper gegen Glutathion-S-Transferase (GST) von *Schistosoma japonicum*

**anti-PI3-Kinase p85**

(*New England Biolabs, Frankfurt am Main*)

Polyklonaler (Kaninchen-) Antikörper gegen die humane p85-Untereinheit der PI3-Kinase

3.1.9.2 Sekundäre Antikörper

Alle sekundären Antikörper (anti-Maus und anti-Kaninchen) waren HRP-konjugiert und wurden von der Firma Dako (*Hamburg*) bezogen.



### 3.1.10 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden in HPLC-gereinigter Form von den Firmen MWG-Biotech (*Ebersberg*) und Dharmacon (*Perbio, Bonn*) bezogen.

#### Oligonukleotide für Punktmutation in der p85-Untereinheit der PI3-Kinase

p85-C-SH2(R36M)

FP: 5'-GGC ACT TTT CTT GTC ATG GAG AGC AGT AAA CAG -3'

RP: 5'-CTG TTT ACT GCT CTC CAT GAC AAG AAA AGT GCC -3'

#### Oligonukleotide für Punktmutationen im N-Terminus des Androgenrezeptors

AR(R100A)

FP: 5'-CAA GCC CAT CGT GCA GGC CCC ACA GGC TAC -3'

RP: 5'-GTA GCC TGT GGG GCC TGC ACG ATG GGC TTG -3'

AR(R210A)

FP: 5'-AGC GGG AGA GCG GCG GAG GCC TCG GGG -3'

RP: 5'-CCC CGA GGC CTC CGC CGC TCT CCC GCT -3'

#### Oligonukleotide für Punktmutationen im C-Terminus des Androgenrezeptors

AR(K720H)

FP: 5'-GTG GTC AAG TGG GCC CAT GCC TTG CCT GGC TTC -3'

RP: 5'-GAA GCC AGG CAA GGC ATG GGC CCA CTT GAC CAC -3'

AR(K777A)

FP: 5'-GAG TAC CGC ATG CAC GCG TCC CGG ATG TAC AGC -3'

RP: 5'-GCT GTA CAT CCG GGA CGC GTG CAT GCG GTA CTC -3'

AR(W741A)

FP: 5'-GTC ATT CAG TAC TCC GCG ATG GGG CTC ATG GTG -3'

RP: 5'-CAC CAT GAG CCC CAT CGC GGA GTA CTG AAT GAC -3'

AR(R788A)

FP: 5'-CAG TGT GTC CGA ATG GCG CAC CTC TCT CAA GAG -3'

RP: 5'-CTC TTG AGA GAG GTG CGC CAT TCG GAC ACA CTG -3'

AR(W796A)

FP: 5'-CTC TCT CAA GAG TTT GGA GCG CTC CAA ATC ACC CCC  
CAG -3'

RP: 5'-CTG GGG GGT GAT TTG GAG CGC TCC AAA CTC TTG AGA  
GAG -3'

AR(Q802A)

FP: 5'-TGG CTC CAA ATC ACC CCC GCG GAA TTC CTG TGC ATG  
AAA -3'

RP: 5'-TTT CAT GCA CAG GAA TTC CGC GGG GGT GAT TTG GAG  
CCA -3'

Oligonukleotide für Punktmutationen im Androgenrezeptor mit klinischem  
Phänotyp

AR(W741C)

FP: 5'-GTC ATT CAG TAC TCC TGC ATG GGG CTC ATG GTG -3'

RP: 5'-CAC CAT GAG CCC CAT GCA GGA GTA CTG AAT GAC -3'

AR(W741R)

FP: 5'-GTC ATT CAG TAC TCC CGG ATG GGG CTC ATG GTG -3'

RP: 5'-CAC CAT GAG CCC CAT CCG GGA GTA CTG AAT GAC -3'

AR(R788S)

FP: 5'-CAG TGT GTC CGA ATG AGT CAC CTC TCT CAA GAG -3'

RP: 5'-CTC TTG AGA GAG GTG ACT CAT TCG GAC ACA CTG -3'

AR(Q802R)

FP: 5'-TGG CTC CAA ATC ACC CCC CGG GAA TTC CTG TGC ATG  
AAA -3'

RP: 5'-TTT CAT GCA CAG GAA TTC CCG GGG GGT GAT TTG GAG  
CCA -3'

Oligonukleotide für die *Real-Time* PCR-Analyse

AR (humaner Androgenrezeptor) (NM\_000044)

FP: 5'-CCT GGC TTC CGC AAC TTA CAC -3'

RP: 5'-GGA CTT GTG CAT GCG GTA CTC -3'

Rib36B4 (Ribosomale Untereinheit Rib36B4) *housekeeping*-Gen (NM\_001002)

FP: 5'- GAA GGC TGT GGT GCT GAT GG -3'

RP: 5'- CCG GAT ATG AGG CAG CAG TT -3'

#### Oligonukleotide für siRNA-Analyse

*Green Fluorescent Protein* (GFP) (Kontroll-siRNA)

5'- GGC UAC GUC CAG GAG CGC ACC TT -3'

Akt1/Akt2 (Katome *et al.*, 2003)

5'- UGC CCU UCU ACA ACC AGG AUU -3'

#### Sequenzierungsprimer

Alle Sequenzierungen wurden bei der Firma GATC (*Konstanz*) in Auftrag gegeben.

N-Terminus des Androgenrezeptors

5'- GCA CCT CCC GGC GCC AGT TTG CTG -3'

C-Terminus des Androgenrezeptors

5'- CCA TCT TGT CGT CTT CGG AAA TG -3'

### **3.1.11 Plasmide und Plasmidkonstrukte**

**pSG5** (Green *et al.*, 1988)

Expressionsvektor mit SV (*simian virus*) 40 Promotor (*Stratagene, La Jolla, CA*)

**pSG5AR<sub>wt</sub>(fin)** (Culig *et al.*, 1993)

Expressionsplasmid mit cDNA des humanen Wildtyp-Androgenrezeptors im Vektor pSG5.

**pSV2neo**

Eukaryontischer Expressionsvektor, der die Selektion transfizierter Zellen durch ein Neomycin-Resistenzgen erlaubt.

### **pSG5AR $\Delta$ TAD** (Gast *et al.*, 1998)

Expressionsvektor mit deletierter cDNA des humanen Androgenrezeptors, die eine verkürzte Form des Androgenrezeptors ohne die Aminosäuren 1 bis 488 ergibt. Die Deletionsmutante wurde durch PCR-Amplifikation erhalten. Der 5'-Primer, der für die Amplifikation verwendet wurde, enthält am Ende eine artifizielle Kozaksequenz (Kozak, 1981) mit einem neuen Transkriptionsstart und einer *Bam*HI-Schnittstelle. Der 3'-Primer enthält eine *Hind*III-Schnittstelle, wodurch das erhaltene Fragment in die entsprechende Schnittstelle des Wildtyprezeptorkonstruktes kloniert wurde.

### **pSG5AR $\Delta$ DBD**

Expressionsvektor mit deletierter cDNA des humanen Androgenrezeptors, die eine verkürzte Form des Androgenrezeptors ohne die Aminosäuren 558 bis 624 ergibt und von Laurent Morel (*Universite Blaise Pascal, Chermont-Ferrand, Frankreich*) zur Verfügung gestellt wurde.

### **pSG5AR $\Delta$ HBD**

Expressionsvektor mit deletierter cDNA des humanen Androgenrezeptors, die eine verkürzte Form des Androgenrezeptors ohne die Aminosäuren 682 bis 919 ergibt. Die Deletionsmutante wurde durch PCR-Amplifikation erhalten. Der 5'-Primer beginnt ab Aminosäure 480 und der 3'-Primer endet mit einem Stopcodon an Aminosäureposition 682 mit einer sich anschließenden *Bgl*II-Schnittstelle. Die amplifizierte Sequenz wurde über die Schnittstellen *Kpn*I/*Bgl*II in die Androgenrezeptorwildtyp-Sequenz im Vektor pSG5 kloniert.

### **pSG5AR(R100A)**

Expressionsvektor mit mutierter cDNA des humanen Androgenrezeptors. Die Punktmutation von Arginin zu Alanin an Aminosäureposition 100 wurde mit Hilfe des *QuikChange<sup>®</sup> II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) eingefügt.

### **pSG5AR(R100A/R788A)**

Expressionsvektor mit mutierter cDNA des humanen Androgenrezeptors. Die Punktmutationen von Arginin zu Alanin an Aminosäureposition 100 und Arginin

zu Alanin an Position 788 wurden mit Hilfe des *QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) eingefügt.

### **pSG5AR(R210A/R788A)**

Expressionsvektor mit mutierter cDNA des humanen Androgenrezeptors. Die Punktmutationen von Arginin zu Alanin an Aminosäureposition 210 und Arginin zu Alanin an Position 788 wurden mit Hilfe des *QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) eingefügt.

### **pSG5AR(R100A/K720H/W741A/K777A/R788A)**

Expressionsvektor mit mutierter cDNA des humanen Androgenrezeptors. Die Punktmutationen Arginin zu Alanin an Aminosäureposition 100, Lysin zu Histidin an Position 720, Tryptophan zu Alanin an Position 741, Lysin zu Alanin an Position 777 und Arginin zu Alanin an Position 788 wurden mit Hilfe des *QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) eingefügt.

### **pSG5AR(R210A/K720H/W741A/K777A/R788A)**

Expressionsvektor mit mutierter cDNA des humanen Androgenrezeptors. Die Punktmutationen Arginin zu Alanin an Aminosäureposition 210, Lysin zu Histidin an Position 720, Tryptophan zu Alanin an Position 741, Lysin zu Alanin an Position 777 und Arginin zu Alanin an Position 788 wurden mit Hilfe des *QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) eingefügt.

### **pSG5AR(R210A)**

Expressionsvektor mit mutierter cDNA des humanen Androgenrezeptors. Die Punktmutation von Arginin zu Alanin an Aminosäureposition 210 wurde mit Hilfe des *QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) eingefügt.

### **pSG5AR(K720H)**

Expressionsvektor mit mutierter cDNA des humanen Androgenrezeptors. Die Punktmutation von Lysin zu Histidin an Aminosäureposition 720 wurde mit Hilfe

des *QuikChange<sup>®</sup> II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) eingefügt.

### **pSG5AR(W741A)**

Expressionsvektor mit mutierter cDNA des humanen Androgenrezeptors. Die Punktmutation von Tryptophan zu Alanin an Aminosäureposition 741 wurde mit Hilfe des *QuikChange<sup>®</sup> II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) eingefügt.

### **pSG5AR(W741C)**

Expressionsvektor mit mutierter cDNA des humanen Androgenrezeptors. Die Punktmutation von Tryptophan zu Cystein an Aminosäureposition 741 wurde mit Hilfe des *QuikChange<sup>®</sup> II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) eingefügt.

### **pSG5AR(W741R)**

Expressionsvektor mit mutierter cDNA des humanen Androgenrezeptors. Die Punktmutation von Tryptophan zu Arginin an Aminosäureposition 741 wurde mit Hilfe des *QuikChange<sup>®</sup> II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) eingefügt.

### **pSG5AR(K777A)**

Expressionsvektor mit mutierter cDNA des humanen Androgenrezeptors. Die Punktmutation von Lysin zu Alanin an Aminosäureposition 777 wurde mit Hilfe des *QuikChange<sup>®</sup> II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) eingefügt.

### **pSG5AR(R788A)**

Expressionsvektor mit mutierter cDNA des humanen Androgenrezeptors. Die Punktmutation von Arginin zu Alanin an Aminosäureposition 788 wurde mit Hilfe des *QuikChange<sup>®</sup> II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) eingefügt.

**pSG5AR(R788S)**

Expressionsvektor mit mutierter cDNA des humanen Androgenrezeptors. Die Punktmutation von Arginin zu Serin an Aminosäureposition 788 wurde mit Hilfe des *QuikChange®II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) eingefügt.

**pSG5AR(Q802A)**

Expressionsvektor mit mutierter cDNA des humanen Androgenrezeptors. Die Punktmutation von Glutamin zu Alanin an Aminosäureposition 802 wurde mit Hilfe des *QuikChange®II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) eingefügt.

**pSG5AR(Q802R)**

Expressionsvektor mit mutierter cDNA des humanen Androgenrezeptors. Die Punktmutation von Glutamin zu Arginin an Aminosäureposition 802 wurde mit Hilfe des *QuikChange®II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) eingefügt.

**pSG5AR(K720H/W741A)**

Expressionsvektor mit mutierter cDNA des humanen Androgenrezeptors. Die Punktmutationen Lysin zu Histidin an Aminosäureposition 720 und Tryptophan zu Alanin an Position 741 wurden mit Hilfe des *QuikChange®II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) eingefügt.

**pSG5AR(K777A/R788A)**

Expressionsvektor mit mutierter cDNA des humanen Androgenrezeptors. Die Punktmutationen Lysin zu Alanin an Aminosäureposition 777 und Arginin zu Alanin an Position 788 wurden mit Hilfe des *QuikChange®II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) eingefügt.

**pSG5AR(W796A/Q802A)**

Expressionsvektor mit mutierter cDNA des humanen Androgenrezeptors. Die Punktmutationen Tryptophan zu Alanin an Aminosäureposition 796 und

Glutamin zu Alanin an Position 802 wurden mit Hilfe des *QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) eingefügt.

### **pSG5AR(K720H/W741A/K777A)**

Expressionsvektor mit mutierter cDNA des humanen Androgenrezeptors. Die Punktmutationen Lysin zu Histidin an Aminosäureposition 720, Tryptophan zu Alanin an Position 741 und Lysin zu Alanin an Position 777 wurden mit Hilfe des *QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) eingefügt.

### **pSG5AR(K720H/W741A/K777A/R788A)**

Expressionsvektor mit mutierter cDNA des humanen Androgenrezeptors. Die Punktmutationen Lysin zu Histidin an Aminosäureposition 720, Tryptophan zu Alanin an Position 741, Lysin zu Alanin an Position 777 und Arginin zu Alanin an Position 788 wurden mit Hilfe des *QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) eingefügt.

### Reportergen-Plasmide für transiente Transfektionen

#### **pGL3 MMTV-luc** (Kaspar *et al.*, 1993)

Dieser Expressionsvektor kodiert für das *Photinus pyralis*-Luziferase-Gen unter der Kontrolle von repetitiven Sequenzen des MMTV-Promotors (*Mouse Mammary Tumor Virus*). Diese wurden als *Bam*HI/*Bgl*II-Fragment inseriert und stammen aus dem pHcwtCAT Plasmid.

#### **pTK Renilla-luc**

Dieses Minimal-Promotor-Konstrukt (tk-Promotor) wurde von der Firma Promega (*Mannheim*) bezogen und dient der konstitutiven Expression des Luziferase-Gens aus *Renilla reniformis*. Die Messung der *Renilla*-Luziferase-Aktivität ermöglichte die Bestimmung der Transfektionseffizienz von transient transfizierten Zellen.



### Plasmide für die Produktion von GST-Fusionsproteinen

Das bakterielle Expressionsplasmid für GST-Fusionsproteine (pGEX-4T-1) wurde von Amersham Biosciences (*Freiburg*) erworben.

#### **pGEX-4T-1-p85wt**

Expressionsvektor, welcher die cDNA der kompletten regulatorischen Untereinheit (p85 $\alpha$ ) der Phosphatidylinositol-3-Kinase enthält. Die cDNA aus einer Rinder-Isoform wurde von Dr. Payraastre aus Toulouse hergestellt.

#### **pGEX-4T-1-p85-SH3**

Expressionsvektor, welcher die cDNA der humanen SH3-Domäne der regulatorischen Untereinheit (p85 $\alpha$ ) der Phosphatidylinositol-3-Kinase enthält. Die cDNA wurde über die Schnittstellen *Bam*HI/*Eco*RI in den Vektor pGEX-4T-1 kloniert und von Silvere Baron (*Universite Blaise Pascal, Frankreich*) zur Verfügung gestellt.

#### **pGEX-4T-1-p85-BCR**

Expressionsvektor, welcher die cDNA der humanen BCR-Domäne der regulatorischen Untereinheit (p85 $\alpha$ ) der Phosphatidylinositol-3-Kinase enthält. Die cDNA wurde über die Schnittstellen *Bam*HI/*Eco*RI in den Vektor pGEX-4T-1 kloniert und von Silvere Baron (*Universite Blaise Pascal, Frankreich*) zur Verfügung gestellt.

#### **pGEX-4T-1-p85-N-SH2**

Expressionsvektor, welcher die cDNA der humanen N-SH2-Domäne der regulatorischen Untereinheit (p85 $\alpha$ ) der Phosphatidylinositol-3-Kinase enthält. Die cDNA wurde über die Schnittstellen *Bam*HI/*Eco*RI in den Vektor pGEX-4T-1 kloniert und von Silvere Baron (*Universite Blaise Pascal, Frankreich*) zur Verfügung gestellt.

#### **pGEX-4T-1-p85-C-SH2**

Expressionsvektor, welcher die cDNA der humanen C-SH2-Domäne der regulatorischen Untereinheit (p85 $\alpha$ ) der Phosphatidylinositol-3-Kinase enthält.

Die cDNA wurde über die Schnittstellen *Bam*HI/*Eco*RI in den Vektor pGEX-4T-1 kloniert und von Silvere Baron (*Universite Blaise Pascal, Frankreich*) zur Verfügung gestellt.

### **pGEX-4T-1-p85-C-SH2 (R36M)**

Expressionsvektor mit mutierter C-SH2-Domäne der regulatorischen Untereinheit (p85 $\alpha$ ) der Phosphatidylinositol-3-Kinase. Die Punktmutation von Arginin zu Methionin an Aminosäureposition 36 wurde mit Hilfe des *QuikChange<sup>®</sup> II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) eingefügt.

### **pGEX-4T-1-AR-AF1**

Expressionsvektor, welcher die cDNA der humanen Androgenrezeptors von Aminosäure 1 bis 520 enthält. Die cDNA wurde über die Schnittstellen *Bam*HI/*Eco*RI in den Vektor pGEX-4T-1 kloniert.

## **3.1.12 Bakterienstämme**

### ***E.coli* DH5 $\alpha$**

Genotyp: F<sup>-</sup>,  $\Phi$ 80 $\Delta$ *lacZ*DM15, *recA*1, *endA*1, *gyrA*96, *thi*-1, *hsdR*17 (*r*<sub>k</sub><sup>-</sup>, *m*<sub>k</sub><sup>+</sup>), *supE*44, *relA*1, *deoR*,  $\Delta$ (*lacZ*YA-*argF*) U169

### ***E.coli* BL21 (DE3) pLysS**

Genotyp: F<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdS*<sub>B</sub>, (*r*<sub>B</sub><sup>-</sup>, *m*<sub>B</sub><sup>-</sup>), *dcm*, *gal*, (DE3), pLysS (Cm<sup>r</sup>)

Dieser Bakterienstamm wurde für die Expression von GST-Fusionsproteinen verwendet.

### ***E.coli* XL-1 Blue** (superkompetente Zellen)

Genotyp: *recA*1, *endA*1, *gyrA*96, *thi*-1, *hsdR*17, *supE*44, *relA*1, *lac* (F<sup>'</sup>*proAB lacI*<sup>q</sup> $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>))

### 3.1.13 Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene humane Prostatakarzinomzelllinien untersucht. Die Zelllinie DU145 wurde aus einer Hirnmetastase des Prostatakarzinoms eines 69-jährigen Europäers (Stone *et al.*, 1978) etabliert. Es handelt sich um epitheliale Zellen, die kein Prostata-spezifisches Antigen (PSA) exprimieren und androgenunabhängig wachsen. Die Prostatakrebszelllinie PC-3 stammt aus einem Prostataadenokarzinom eines 62-jährigen Patienten und ist ebenfalls hormonunabhängig (Kaighn *et al.*, 1980). Die Zelllinie 22Rv1 ist aus dem Maus-Xenograft CWR22 hervorgegangen (Sramkoski *et al.*, 1999) und exprimiert PSA. Alle Prostatakarzinomzelllinien wurden in RPMI 1640 mit 10 % FBS kultiviert.

L6 Skelettmuskelzellen sind Myoblasten und entstammen dem Oberschenkelmuskel von Ratten. Diese Zelllinie wurde stabil mit dem Androgenrezeptor-Wildtyp transfiziert. Die Kultivierung der Muskelzelllinien erfolgte in DMEM mit 10 % FBS und 2 mM L-Glutamin.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Allgemeine Methoden zur Behandlung von Nukleinsäuren

#### 3.2.1.1 Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Zur Reinigung einer wässrigen Nukleinsäurelösung von Proteinen wurden zur Lösung dieselben Volumina Roti® Phenol (*Roth, Karlsruhe*) und Chloroform (als Gemisch Chloroform/Isoamylalkohol 24:1) gegeben und gut gemischt. Zur Trennung der Phasen wurde 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Oberphase wurde abgenommen und noch zweimal mit dem gleichen Volumen an Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gemischt und abzentrifugiert, um das Phenol vollständig zu entfernen. Die so aufgereinigte nukleinsäurehaltige Oberphase konnte nun für weitere Experimente verwendet werden.

### 3.2.1.2 Präzipitation von Nukleinsäuren aus wässriger Lösung

Um Nukleinsäuren aus einer wässrigen Lösung zu fällen, wurde die Lösung mit 3 M Natriumazetat-Lösung pH 4,8 auf eine Endkonzentration von 0,3 M gebracht, mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol (oder 1 Volumen Isopropanol) versetzt und gut gemischt. Als Fällungshilfe wurde Linear Acrylamid (*Ambion, Darmstadt*) hinzugegeben. Die Präzipitation erfolgte für mindestens 30 min bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  oder für mindestens 10 min bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Anschließend wurde das Präzipitat bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 12.000 rpm 30 min zentrifugiert. Zur Entfernung von Salzen wurde zweimal mit kaltem, 70 %igem Ethanol gewaschen, jeweils für 5 min bei RT zentrifugiert und abschließend das Pellet luftgetrocknet.

### 3.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässriger Lösung erfolgte spektralphotometrisch durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine Extinktion von 1 entspricht 50  $\mu\text{g/ml}$  (doppelsträngiger) DNA oder 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA. Einen Hinweis auf die Reinheit gibt die Extinktion bei 280 nm. Das Verhältnis  $\text{OD}_{260} : \text{OD}_{280}$  sollte im Idealfall 1,8 (bei DNA) bzw. 2 (bei RNA) sein. Die Messung der DNA- und RNA-Konzentration erfolgte mit einem UV/Vis-Spektralphotometer NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 (*PeqLab, Erlangen*).

## 3.2.2 DNA-Methoden

### 3.2.2.1 Fragmentierung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Für die Fragmentierung von DNA durch Restriktionsendonukleasen wurden pro Mikrogramm Plasmid-DNA 2-3 U Enzym eingesetzt und für 2 h inkubiert. Die Reaktion wurde unter den vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen durchgeführt. Bei einem Doppelverdau wurden Enzyme mit gleichem Pufferanspruch gemeinsam zugegeben, andernfalls wurde zuerst der Verdau bei niedrigerer Ionenstärke durchgeführt und nach Phenol/Chloroform-Extraktion (s. Kapitel 3.2.1.1) und Ethanol-Fällung (s. Kapitel 3.2.1.2) das

zweite Enzym mit entsprechendem Puffer höherer Ionenstärke hinzupipettiert. Zur Größenbestimmung und Reinigung der Fragmente wurde die DNA anschließend in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (s. Kapitel 3.2.2.2).

### 3.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente erfolgte die Separation in einem 0,8- bis 2 %igem Agarosegel. Hierzu wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris pH 7,2, 2 mM Natriumazetat, 1 mM EDTA pH 8,0) oder 1x TBE-Puffer (90 mM Tris pH 8,3, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA pH 8,0) gegeben und aufgekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Abkühlen der Agarose-Lösung auf ca. 60 °C wurde Ethidiumbromid (10 mg/ml) in einer Endkonzentration von 0,3 µg/ml zugegeben und die Agarose wurde in eine horizontale Elektrophoresekammer (*PeqLab, Erlangen*) gegossen. Das polymerisierte Gel wurde vollständig mit 1x TAE- bzw. 1x TBE-Puffer überschichtet und die mit DNA-Ladepuffer (10 mM EDTA pH 8,0, 0,1 % SDS, 10 % Glycerin, 0,03 % Bromphenolblau) versetzten Proben in die ausgesparten Taschen pipettiert. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde dabei auch ein geeigneter DNA-Längenstandard (*PeqLab, Erlangen*) mit auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in der Regel bei 70 - 100 V. Die DNA-Banden wurden unter UV-Bestrahlung (*Transilluminator IL-350, Bachofer, Reutlingen*) sichtbar gemacht und zur Dokumentation mit einem Eagle-Eye-Photokamerasystem (*Stratagene, La Jolla, CA*) fotografiert.

### 3.2.2.3 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die entsprechenden Banden wurden nach der Auftrennung im Agarosegel unter einem langwelligen UV-Transilluminator, zur Vermeidung möglicher UV-*crosslinks* und anderer DNA-Schäden, lokalisiert und mittels eines sterilen Skalpells aus dem Gel herausgeschnitten. Das DNA-enhaltende Gelstück wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Elution der DNA aus der Gelmatrix erfolgte unter Verwendung des *QIAquick Gel Extraction Kit* (*Qiagen, Hilden*) nach folgender Vorgehensweise:

Das Gelstück wurde mit dem 3-fachen Volumen des QG-Puffers versetzt und für 10 min bei 50 °C unter Schütteln komplett gelöst. Die Lösung sollte eine gelbe Farbe besitzen. War dies nicht der Fall, konnte durch Zugabe von 3 M Natriumazetat pH 5,0 der richtige pH-Wert eingestellt werden. Zur Bindung der DNA wurde die Lösung auf eine Qiagen-Säule gegeben und für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Um alle Agarosereste zu entfernen, wurde der Durchfluss verworfen und nochmals 500 µl QG-Puffer auf die Säule gegeben und zentrifugiert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit 750 µl PE-Puffer. Der Waschpuffer wurde durch zwei Zentrifugationen für jeweils 1 min bei 13.000 rpm von der Säule entfernt. Die Säule wurde nun in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 50 µl dH<sub>2</sub>O beschichtet und für 1 min inkubiert. Die Elution der DNA erfolgte durch Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm.

### 3.2.2.4 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Überhängen

Für die 5'-Dephosphorylierung von linearisierter, gelgereinigter DNA wurde eine Phosphatasebehandlung durchgeführt. Die DNA wurde mit 2 U alkalischer Phosphatase in einem Volumen von 40 µl versetzt. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37 °C. Die dephosphorylierte DNA wurde anschließend durch Phenol/Chloroform-Extraktion (s. Kapitel 3.2.1.1) und Präzipitation (s. Kapitel 3.2.1.2) aufgereinigt.

### 3.2.2.5 T4 DNA-Polymerase zur Herstellung von *blunt ends*

Für die Herstellung von glatten Enden (*blunt ends*) wurde das isolierte DNA-Fragment in T4 DNA-Polymerase-Puffer (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,9, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT) zusammen mit 50 µg/ml BSA, 100 µM dNTP-Lösung sowie 3 U T4 DNA-Polymerase pro Mikrogramm DNA für 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 75 °C für 10 min infolge der Hitzeinaktivierung des Enzyms gestoppt. Zur Ligation der DNA-Enden wurde die DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion (s. Kapitel 3.2.1.1) und anschließender Präzipitation (s. Kapitel 3.2.1.2) aus dem Reaktionsgemisch extrahiert.

### 3.2.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden in einem molaren Verhältnis von 5:1 (Fragment:Vektor) gemischt, mit 2 µl 10x Ligasepuffer (50 mM Tris pH 7,4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM Spermidin, 1 mM ATP) und 1-3 U T4 DNA-Ligase versetzt. Dabei wurde das Volumen der Reaktion mit dH<sub>2</sub>O auf 20 µl ergänzt und für 16 h bei 16 °C inkubiert. Zur weiteren Analyse wurden 2 µl des Ligationsansatzes in kompetente Bakterien transformiert (s. Kapitel 3.2.2.7).

### 3.2.2.7 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Zu 200 µl kompetenten Bakterien wurden auf Eis 2 µl Ligationsansatz gegeben und der Ansatz 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach 2 min Hitzeschock bei 42 °C und anschließenden 2 min auf Eis, wurde 1 ml SOC-Medium (2 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glucose) zugegeben und 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Danach wurden 100 µl der Bakterienkultur auf Selektivagarplatten (LB-Medium (1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl) und 1,5 % Bacto-Agar) mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.2.8 Plasmid-DNA-Minipräparation

Zur Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA wurde das *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Mannheim)* genutzt. Dazu wurden einzelne Bakterienklone mit einer Pipettenspitze von einer Selektivagarplatte gepickt und in 3 ml LB-Medium (1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl) mit dem entsprechenden Antibiotikum (meist 100 mg/ml Ampicillin) versetzt und über Nacht bei 37 °C schüttelnd kultiviert. Von dieser Übernachtskultur wurden 1,5 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 5.000 rpm abzentrifugiert. Das so erhaltene Bakterienpellet wurde in 250 µl Resuspensionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 100 µg/ml Rnase A) aufgenommen, mit 250 µl Lysispuffer (0,2 M NaOH, 1 % SDS) versetzt, gemischt und nach Zugabe von 10 µl Alkaliner Proteaselösung für

5 min bei RT inkubiert. Nach Hinzufügen von 350 µl Neutralisierungspuffer (4,09 M Guanidin-Hydrochlorid, 0,759 M Kaliumazetat, 2,12 M Eisessig; pH 4,2) wurde für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die sich im Überstand befindende Plasmid-DNA wurde auf die vom Hersteller zur Verfügung gestellte DNA-bindende Säule aufgetragen und für 1 min zentrifugiert. An die drei Waschschrte mit 750 µl und zweimal 250 µl Waschpuffer (162,8 mM Kaliumazetat, 22,6 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,109 mM EDTA pH 8,0), wobei jeweils für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert wurde, folgte die Elution der Plasmid-DNA in 50 µl dH<sub>2</sub>O.

### 3.2.2.9 Plasmid-DNA-Maxipräparation

Die Plasmidpräparation erfolgte durch Ionenaustauscher-Säulenchromatographie mit *Qiagen-tip-500-Säulen* (*Qiagen, Hilden*). Eine Bakterienkultur wurde in 500 ml LB-Medium (1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl) mit dem entsprechenden Antibiotikum über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Bakterienkultur wurde 10 min bei 5.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml Puffer 1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA pH 8,0, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert und anschließend 10 ml Puffer 2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) zugegeben. Die Suspension wurde durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 10 ml Puffer 3 (3 M Natriumazetat-Lösung pH 4,8) zugegeben und anschließend 30 min bei 9.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit Puffer QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15 % Ethanol, 0,15 % Triton X-100) äquilibrierten *Qiagen-tip-500-Säule* gegeben, wobei die DNA an die Säulenmatrix gebunden wurde. Nach Durchfluss dieses Überstandes wurde die Säule 2x mit je 30 ml Puffer QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15 % Ethanol) gewaschen und die DNA mit 15 ml Puffer QF (1,25 M NaCl, 50 mM MOPS pH 8,2, 15 % Ethanol) eluiert. Durch Zugabe von 12 ml Isopropanol wurde die DNA präzipitiert und durch Zentrifugation für 30 min bei 10.000 rpm und 4 °C pelletiert. Nach Waschen des Pellets mit 70 %igem Ethanol und Trocknen an der Luft, wurde die DNA in Wasser oder TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0) gelöst und die Konzentration bestimmt (s. Kapitel 3.2.1.3). Die so präparierte Plasmid-DNA wurde bei –20 °C aufbewahrt.



### 3.2.2.10 Generierung von gezielten Punktmutationen

Die gezielte Punktmutagenese wurde mit dem *QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) durchgeführt. Für die *in vitro*-Mutagenese konnte ein doppelsträngiges Plasmid mit der gewünschten cDNA verwendet werden. Hierfür wurden spezielle Oligonukleotide (MWG-Biotech, Ebersberg) erstellt, die jeweils an die gleiche Sequenz der komplementären Stränge binden und die gewünschte Mutation enthielten. Die Mutation befand sich in der Mitte der Primer, mit beiderseits 10-15 korrekten Basen und einem GC-Gehalt von mindestens 40 %. Die PCR erfolgte in Anwesenheit von 10 ng der Template-DNA, jeweils 125 ng der Sequenz-spezifischen Oligonukleotide (*forward* und *reverse* Primer), 2 mM dNTP-Mix, 5 µl 10x Reaktionspuffer und 2,5 U *PfuUltra* High-Fidelity DNA Polymerase in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Im Anschluss an die PCR-Reaktion, die nach Herstellerangaben erfolgte, wurden 10 µl der Amplifikationsprodukte durch gelelektrophoretische Auftrennung in einem 1 %igen TAE-Agarosegel überprüft (s. Kapitel 3.2.2.2). Die nach der PCR ebenfalls enthaltene parentale Plasmid-DNA ohne Mutation wird durch einen Restriktionsverdau eliminiert. Da bakteriell exprimierte Plasmid-DNA methyliert ist, nicht aber die mittels PCR amplifizierte DNA, wird die parentale DNA durch die Zugabe von 10 U *DpnI* für 1 h bei 37 °C verdaut. Die durch die PCR entstandene und die Mutation tragende Plasmid-DNA bleibt unversehrt und wurde anschließend in *E. coli* XL-1 Blue superkompetente Bakterien transformiert (s. Kapitel 3.2.2.7). Für einen schnellen Nachweis der Mutation wurde durch die Mutagenese auch eine veränderte Erkennungssequenz für ein weiteres Restriktionsenzym eingeführt. War dies nicht der Fall, wurde die erfolgreiche Mutagenese durch Sequenzierung (*GATC*, *Konstanz*) nachgewiesen.

### 3.2.3 RNA-Methoden

#### 3.2.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus der Prostatakrebszelllinie 22Rv1 wurde der *NucleoSpin® RNA II Kit* (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Die adhären

wachsenden Zellen wurden zunächst trypsinisiert und für 3 min bei 900 rpm zentrifugiert. Das so erhaltene Zellpellet wurde in PBS resuspendiert, erneut abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden durch Zugabe von 350 µl RA1-Puffer und 3,5 µl  $\beta$ -Mercaptoethanol lysiert. Das Lysat wurde anschließend fünfmal durch eine Injektionskanüle (d=0,9 mm, *Becton-Dickinson, Heidelberg*) gezogen und auf eine *NucleoSpin*<sup>®</sup>-Filtriersäule transferiert und für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Danach wurde das homogenisierte Lysat mit 350 µl 70 %igem Ethanol vermischt und auf eine *NucleoSpin*<sup>®</sup> RNA II-Säule pipettiert und für 30 s bei 13.000 rpm zentrifugiert. Durch Zugabe von 350 µl *Membrane Desalting Buffer* und anschließender Zentrifugation für 1 min bei 13.000 rpm wurde das an die Siliziumdioxid-Matrix gebundene RNA-Präzipitat gewaschen. Zur Entfernung von genomischer DNA wurden 90 µl eines DNase-Reaktionsansatzes appliziert und für 15 min bei RT inkubiert. Das Waschen der Säule erfolgte mit 200 µl RA2-Puffer, 600 µl und 250 µl RA3-Puffer mit 80 %igem Ethanol, wobei jeweils für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert wurde. Die gefällte RNA wurde schließlich in 60 µl RNase-freiem Wasser eluiert und für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Ein Aliquot von 1,5 µl wurde für die Extinktionsmessung zur Bestimmung der RNA-Konzentration verwendet (s. Kapitel 3.2.1.3).

### 3.2.3.2 Auftrennung von RNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von 0,5 µg Gesamt-RNA in einem denaturierenden Agarosegel wurde 1 g Agarose in 100ml MOPS-Puffer, pH 7,0 (20 mM 4-Morpholinpropansulfonsäure, 5 mM Natriumazetat, 1 mM EDTA pH 8,0) gelöst. Das Gel wurde durch Erhitzen verflüssigt und mit 3 ml 37 %iger Formaldehyd-Lösung versehen, in eine RNase-freie Gelelektrophoresekammer gegossen und nach dem Polymerisieren mit MOPS-Puffer überschichtet. Unmittelbar vor dem Auftragen der Proben auf das Gel, wurden die RNA-Proben mit dem 3-fachen Volumen RNA-Ladepuffer (1x MOPS, 17,6 % Formaldehyd, 50 % deionisiertes Formamid, 3,3 mg/ml Ethidiumbromid, 5 % Glycerol, 1 mM EDTA, 0,03 % Bromphenolblau) versetzt und für 15 min bei 56 °C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte bei 90 V. Die Banden im Gel wurden anschließend unter UV-Licht (*Transilluminator IL-350, Bachofer, Reutlingen*)

sichtbar gemacht und zur Dokumentation photographiert. Die Integrität sowie das mengenmäßige Verhältnis der 28S und 18S rRNA-Bande (ca. 1,5-2) wurden als Parameter für die Unversehrtheit der isolierten Gesamt-RNA herangezogen und visuell abgeschätzt.

### 3.2.3.3 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

Jeweils 0,5 µg Gesamt-RNA wurde in einem Volumen von 14 µl mit 200 ng *Random*-Oligonukleotidprimer für 5 min bei 70 °C und anschließend für 1 min bei 4 °C inkubiert. Die Transkription erfolgte in Anwesenheit von 0,5 mM Desoxynukleotidtriphosphat (dNTP), 200 U M-MLV-RT (*Moloney-Murine Leukemia Virus-Reverse Transcriptase*) und 5 µl 5x Reaktionspuffer in einem Volumen von 25 µl. Zum Nachweis von Rückständen genomischer DNA wurde die gleiche Reaktion in einem 12,5 µl Volumen ohne M-MLV-RT angesetzt. Beide Ansätze wurden zunächst für 10 min bei 20 °C und anschließend für 60 min bei 42 °C inkubiert. Die Enzymaktivierung wurde durch Erhitzen für 15 min bei 70 °C erreicht. Nach 5 min bei 4 °C wurden 75 µl dH<sub>2</sub>O zugegeben. Die daran anschließende Polymerase-Kettenreaktion (PCR) diente der qualitativen Kontrolle der synthetisierten cDNA und der Detektion von genomischer DNA. Hierfür wurden 5 µl cDNA-Syntheseansatz mit je 0,5 µM β-Aktin-Sequenz-spezifischen Oligonukleotiden, 200 nM dNTP-Lösung (je 200 nM dATP; dCTP; dGTP; dTTP; pH 7,0) und 1,25 U Taq-Polymerase und 4 µl 5x PCR-Puffer (*Promega, Mannheim*) in einem Gesamtvolumen von 20 µl angesetzt. Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 94 °C für 1 min, die Hybridisierung der Primer bei 60 °C für 1 min und die DNA-Synthese bei 72 °C für 1 min. Die Amplifikationsprodukte wurden nach 30 Zyklen durch gelelektrophoretische Auftrennung in einem 2 %igen TBE-Agarosegel überprüft (s. Kapitel 3.2.2.2).

### 3.2.3.4 Quantitative *Real-Time* PCR-Analyse

Bei der quantitativen Analyse der cDNA-Menge ausgewählter Gene wurden dreimal 5 µl cDNA-Synthesansatz mit je 0,5 µM Sequenz-spezifischen Oligonukleotiden (*forward* und *reverse* Primer) und 10 µl 2x *QuantiTect*<sup>®</sup>-

*SYBR® Green PCR Kit* (Qiagen, Hilden) in einem Volumen von 20 µl angesetzt. Der verwendete Master-Mix enthielt dabei neben dem Fluoreszenzfarbstoff *SYBR® Green I*, der in doppelsträngige DNA interkaliert, auch den Referenzfarbstoff ROX sowie dNTP's, die thermostabile Taq-DNA-Polymerase und die für die Enzymaktivität notwendigen Salzkonzentrationen (*SYBR® Green-PCR Puffer*). Die Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen mit dem *ABI Prism Sequence Detection System 7000* (*Applied Biosystems, Darmstadt*): Inkubation bei 50 °C für 2 min und 95 °C für 15 min, gefolgt von 40 Zyklen, bestehend aus der Denaturierung bei 95 °C für 15 s und der Hybridisierung bei 60 °C für 1 min. Durch eine mitgeführte Kontrolle ohne cDNA (*no template control*; NTC) wurde die Reinheit der verwendeten Reagenzien sowie die Spezifität der Primer überprüft. Nach Ablauf der PCR-Reaktion wurden die Amplifikationsprodukte in einem sogenannten Dissoziationsprotokoll 5 min bei 95 °C denaturiert und langsam auf 60 °C abgekühlt. Hierbei wurde die Kinetik der Renaturierung der komplementären Stränge analysiert und in einer Schmelzkurve dargestellt. Anhand der für jedes Amplikon charakteristischen Schmelzkurve kann überprüft werden, ob unspezifische Primer-DNA-Hybridisierungen zu unerwünschten Nebenprodukten geführt haben.

Für die Auswertung der *Real-Time* PCR ist die Festlegung eines sogenannten Schwellenwertes (*Threshold*; TH) wichtig. Dieser Schwellenwert ist eine definierte Fluoreszenzintensität die deutlich über der Hintergrundfluoreszenz des ungebundenen Farbstoffes liegt. Die „Threshold-Linie“ wird innerhalb der exponentiellen Amplifikationsphase gelegt. Die Zyklusnummer, bei der dieser Schwellenwert in den einzelnen Reaktionsansätzen erreicht wurde, wird als „Threshold-cycle“ oder Ct bezeichnet. Dieser Ct-Wert ist für jede einzelne Probe charakteristisch und dient als Grundlage für die weitere Quantifizierung. Mit Hilfe von mitgeführten Standards, sogenannter *housekeeping*-Gene, wie z.B. Rib36B4 (Ribosomale Untereinheit, Rib36B4), kann der Ct-Wert normalisiert und die Regulation berechnet werden.

### 3.2.4 Protein-Methoden

#### 3.2.4.1 Präparation von Gesamtzelllysat

Zur Gewinnung des für die Immunoblot-Analyse eingesetzten Gesamtzelllysates wurde NP40-Lysispuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8,0, 5 mM EDTA pH 8,0, 1 % NP40, 1 % *Protease Inhibitor Cocktail* (PIC)) verwendet. Das Kulturmedium der adhärent wachsenden Zellen wurde verworfen, die Zellen einmal mit eiskaltem PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) gewaschen, in 1 ml PBS von der Platte abgeschabt und in ein gekühltes Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen kurz bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50 - 100 µl NP40-Lysispuffer resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde für 15 min bei 4 °C und 12.000 rpm zentrifugiert und das Lysat in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Ein Aliquot von 2 µl wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet (s. Kapitel 3.2.4.2). Vor dem Auftragen der Lysate auf ein Polyacrylamidgel wurde das gleiche Volumen an 2x Laemmli-Probenpuffer (160 mM Tris-HCl pH 6,8, 4 % SDS, 20 % Glycerin, 4 % β-Mercaptoethanol, 0,02 % Bromphenolblau) zugegeben, gemischt und für 10 min bei 95 °C im Heizblock inkubiert.

#### 3.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von Gesamtzelllysat wurden jeweils 2 µl Lysat zu 1 ml 1x *Bradford Protein Assay Dye* (Bio-Rad, München) gegeben und gemischt. Parallel dazu wurden 2 µl NP40-Lysispuffer sowie 0, 1, 2, 4, und 6 µl BSA (*Bovine Serum Albumine*) (1 mg/ml) ebenfalls mit 1 ml 1x Bradford Reagenz gemischt. Aus jedem Ansatz wurden 200 µl in eine Mikrotiter-Platte pipettiert und die Extinktion bei 595 nm gegen den Leerwert (Bradford-Reagenz mit NP40-Lysispuffer) in einem ELISA-Lesegerät (*ELx808<sub>IU</sub> Ultra Microplate Reader, BIO-TEK Instruments, INC., Bad Friedrichshall*) spektralphotometrisch gemessen. Durch Berechnung der Steigung der BSA-Eichkurve ließ sich die Konzentration der Proteinlösung bestimmen.

### 3.2.4.3 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE)

Zur Analyse von Proteinen mittels SDS-PAGE wurde ein 10 %iges Trenngel und ein 5 %iges Sammelgel verwendet. Hierzu wurden zuerst 30 ml Trenngel (375 mM Tris-HCl pH 8,8, 10 % Acrylamid, 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,05 % TEMED) zwischen zwei fixierte Glasplatten (20x20 cm, 1,5 mm Abstand) gegossen und mit 70 %igem Rotisol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Rotisol mit dH<sub>2</sub>O abgewaschen, 10 ml Sammelgel (125 mM Tris-HCl pH 6,8, 5 % Acrylamid, 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,1 % TEMED) auf das Trenngel gegossen und mit einem Kamm (15 Taschen) bestückt. Nach dem Polymerisieren wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine vertikale Laufapparatur (*PeqLab, Erlangen*) eingespannt und mit 1x Laemmli-Puffer (25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1 % SDS) bedeckt. Vor dem Auftragen der Proben wurden die Lysate für 10 min bei 95 °C erhitzt und anschließend kurz bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Die Gelelektrophorese erfolgte zunächst bei 60 V. Nachdem die Bromphenolblau-Front das Trenngel erreicht hatte, wurde die Spannung auf 160 V erhöht. Um das Molekulargewicht der Proteine bestimmen zu können, wurde gleichzeitig ein geeigneter Molekulargewichts-Standard (*PeqGOLD Protein-Marker IV, PeqLab, Erlangen*) mit vorgefärbten Proteinen auf das Gel aufgetragen.

### 3.2.4.4 Coomassie-Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Zur Coomassie-Färbung von SDS-Gelen wurden diese zunächst dreimal für 1 min mit kochendem dH<sub>2</sub>O versetzt und schüttelnd inkubiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Wasser verworfen und durch *SimplyBlue™ SafeStain*-Lösung (*Invitrogen, Karlsruhe*) ersetzt und für 1 min auf höchster Stufe in der Mikrowelle aufgeköcht. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 5 min auf dem Schüttler. Der Hintergrund wurde durch Waschen für 10 min mit dH<sub>2</sub>O entfärbt. Die Zugabe von 20 %iger NaCl-Lösung und weiteres Entfärben mit Wasser erhöhte die Intensität und den Kontrast der Banden. Für eine Aufbewahrung der gefärbten SDS-Gele wurden diese für 2 h im Geltrockner (*Bio-Rad, München*) behandelt.

### 3.2.4.5 Transfer von Proteinen auf Membranen und Detektion mit spezifischen Antikörpern (*Western blot*)

Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen wurden mit Hilfe einer Nasstransfer-Kammer (*Trans-Blot<sup>®</sup> Cell, Bio-Rad, München*) auf eine Immobilon-P-Membran (*Millipore, Schwalbach*) übertragen. Zuvor wurde die Membran für ca. 1 min in Methanol äquilibriert und anschließend einmal mit Transferpuffer (25 mM Tris-Base, 190 mM Glycin, 20 % Methanol) gewaschen. Membran und Proteingel wurden dann luftblasenfrei zwischen je drei Lagen 3MM Whatmann-Papier (*Roth, Karlsruhe*) platziert, mit Hilfe einer Kassette fixiert und in eine mit Transferpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt, so dass die Membran zur Anode hin orientiert war. Der Transfer erfolgte über Nacht bei 4 °C und 300 - 350 mA. Nach beendetem Transfer wurde die Membran kurz in PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h bei RT in Blockierlösung (TBST (10 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20) mit 5 - 10 % Magermilchpulver oder 5 % BSA) geschwenkt. Anschließend wurde die Membran in TBST/5 - 10 % Magermilch oder TBST/5 % BSA (bei Phosphospezifischen Antikörpern) inkubiert mit dem jeweiligen Primärantikörper (Verdünnung je Antikörper: 1:500 - 1:2000) für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C unter ständigem Rotieren inkubiert. Die Membran wurde dann dreimal für 10 min in TBST gewaschen und mit dem entsprechenden Meerettich-Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper (1:2000) analog zur ersten Hybridisierung für 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min in TBST wurden die spezifisch erkannten Proteinbanden mit Hilfe des an den Primärantikörper gebundenen Sekundärantikörpers durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Diese Licht-freisetzende Reaktion basiert auf der Oxidation eines Substrates, welche durch die Meerettich-Peroxidase katalysiert wird. Hierzu wurde die Membran 1 min mit ECL *Western blot* Reagenzien (*Amersham Biosciences, Freiburg*) beschichtet und in Folie eingeschlagen. In der Dunkelkammer wurde dann so lange ein Röntgenfilm (*ECL oder MP Hyperfilm, Amersham Biosciences, Freiburg*) exponiert, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Die Filme wurden anschließend in einem Kodak M35 X-OMAT Prozessor (*New Haven, USA*) entwickelt.

#### 3.2.4.6 Lösen von Immunkomplexen (*Stripping* von *Western blot* Membranen)

Um eine *Western blot* Membran mit verschiedenen Antikörpern analysieren zu können, wurde die Membran nach der ECL-Analyse für 10 min mit PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) gewaschen und dann in vorgewärmter „*Stripping*“-Lösung (62,5 mM Tris pH 6,8, 2 % SDS, 0,75 %  $\beta$ -Mercaptoethanol) für 30 min bei 55 - 60 °C unter Schütteln inkubiert. Zur Entfernung des  $\beta$ -Mercaptoethanols wurde anschließend fünfmal für 15 min mit PBS gewaschen.

### 3.2.5 Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe von GST-Fusionsproteinen

#### 3.2.5.1 Produktion und Reinigung von Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteinen

Die Produktion eukaryontischer Proteine wird durch die Fusion mit dem Protein Glutathion-S-Transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* ermöglicht. Dadurch lassen sich große Mengen an löslichen Protein in Bakterien exprimieren (Smith und Johnson, 1988). Für die Reinigung der Fusionsproteine aus bakteriellem Rohlysate nutzt man die hohe Affinität von GST zu Glutathion, welches an Sepharose immobilisiert wurde. Die cDNA des zu exprimierenden Proteins ist hierzu in einem speziellen Vektor (pGEX-4T-1, *Invitrogen, Karlsruhe*) an das 3'-Ende des GST-Gens kloniert. Zur Expression der Plasmide wurde der *E.coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS verwendet, der mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transformiert wurde.

100 ml einer Vorkultur dieses Bakterienstammes wurden mit 1 L 2x LB-Selektionsmedium (2 % Hefeextrakt, 4 % Bacto-Trypton, 2 % NaCl, 100 µg/ml Ampicillin) bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nachdem die Bakterien bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,5 herangewachsen waren, wurde die Expression des Fusionsproteins durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert und die Bakterien weitere 3-5 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation für 20 min bei 6.000 rpm und 4 °C sedimentiert und in 10 ml PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) mit 2 mM EDTA und



2 mM PMSF resuspendiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Anschließend wurde eine Spatelspitze Lysozym zu den Bakterien gegeben, kurz gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Durch Sonifizieren (*Branson Sonifier cell disrupter B15, G.Heinemann, Schwäbisch Gmünd*) wurden die Zellen lysiert. Nach Zugabe von 1 % Triton X-100 (*Roth, Karlsruhe*) wurde wiederum 10 min auf Eis inkubiert. Die unlöslichen Bakterienbestandteile wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 9.000 rpm und 4 °C abgetrennt. Zur Kopplung der GST-Fusionsproteine wurde der Überstand mit in PBS äquilibrierter *Glutathion-Sepharose<sup>TM</sup> 4B (Amersham Biosciences, Freiburg)* für 1 h bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 10 ml eiskaltem PBS wurde die Glutathion-Sepharose mit dem gebundenen Fusionsprotein auf eine Säule transferiert. Das Fusionsprotein wurde mit jeweils 500 µl Elutionspuffer (5 mM reduziertes Glutathion mit 50 mM Tris pH 8,0) in sechs Fraktionen aus der Säule eluiert. Die Anwesenheit des Fusionsproteins in den einzelnen Fraktionen wurde durch elektrophoretische Auftrennung in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel (s. Kapitel 3.2.4.3) und anschließender Coomassie-Färbung (s. Kapitel 3.2.4.4) überprüft. Fraktionen mit hohem Gehalt an Fusionsproteinen wurden vereinigt und zur Konzentrationsbestimmung nochmals in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel, zusammen mit definierten Mengen BSA als Standard, aufgetrennt und gefärbt. Durch Vergleich der Bandenintensitäten der Fusionsproteine mit denen des Standards wurde die Konzentration abgeschätzt. Das gereinigte Fusionsprotein wurde in Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.2.5.2 *In vitro* Transkription/Translation von Proteinen

Mit Hilfe des *TNT<sup>®</sup>T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega, Mannheim)* konnte der Androgenrezeptor bzw. die Androgenrezeptormutanten für den GST-Fusionsprotein-Interaktionstest *in vitro* exprimiert und mit L-[<sup>35</sup>S]-Methionin radioaktiv markiert werden. Zu 1 µl Plasmid-DNA (0,5 µg/µl) wurden 3 µl L-[<sup>35</sup>S]-Methionin und 40 µl *TNT<sup>®</sup>T7 Quick Master-Mix* zugegeben und mit dH<sub>2</sub>O auf 50 µl aufgefüllt. Die Reaktionsansätze wurden auf Eis gemischt und anschließend 1,5 h bei 30 °C inkubiert.

Nachfolgend wurden die Proteine für 10 min bei RT mit DHT (Endkonzentration  $10^{-7}$  M) oder 80 % Ethanol behandelt.

### 3.2.5.3 GST-Fusionsprotein-Interaktionstest (*pull down*)

Die Interaktion zweier Proteine wurde mit Hilfe von bakteriell exprimierten GST-Fusionsproteinen und *in vitro* translatierten Proteinen untersucht. Etwa 10 µg gereinigtes GST-Fusionsprotein wurde an 40 µl Glutathion-Sepharose (in PBS mit 1 % Triton X-100 äquilibriert) in einem Volumen von 200 µl PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) mit 10 % Glycerin und 1 mM DTT für 30 min bei RT unter Rotieren gebunden. Anschließend wurde die Glutathion-Sepharose zweimal mit kaltem PBS und einmal mit kaltem LBST-Puffer (20 mM HEPES-KOH pH 7,9, 100 mM NaCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA, 0,05 % NP40, 1,5 % Triton X-100) gewaschen. Die mit Fusionsprotein beladene Glutathion-Sepharose wurde mit 10 µl des entsprechenden *in vitro* translatierten L-[<sup>35</sup>S]-markierten Proteins in einem Gesamtvolumen von 200 µl LBST-Puffer mit 1 mM DTT und 1 mM PMSF gemischt. Unter Rotieren für 30 min bei RT und 30 min bei 4 °C wurde eine Interaktion zwischen den beiden Proteinpartnern ermöglicht. Anschließend wurde die Glutathion-Sepharose viermal auf Eis mit kaltem LBST-Puffer gewaschen. Die an das Glutathion gebundenen Proteine wurden schließlich durch Zugabe von 25 µl 2x Laemmli-Probenpuffer (160 mM Tris pH 6,8, 4 % SDS, 20 % Glycerin, 4 % β-Mercaptoethanol, 0,02 % Bromphenolblau) und Erhitzen für 10 min bei 95 °C von der Glutathion-Sepharose eluiert. Die Analyse der Proteine erfolgte durch Auftrennung in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel (s. Kapitel 3.2.4.3). Nachfolgend wurden die Polyacrylamidgele für 30 min in einer 1 M Natrium-Salicylat-Lösung, 5 min in dH<sub>2</sub>O und 30 min in Destain-Puffer (50 % Methanol, 40 % Essigsäure, 10 % dH<sub>2</sub>O) schüttelnd inkubiert. Abschließend wurden die SDS-Gele für 2 h auf dem Gelrockner (*Bio-Rad, München*) getrocknet und autoradiographisch dokumentiert.

### 3.2.6 Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen durch Peptidarrays

Für Peptidarrays gibt es eine Vielzahl von Anwendungen. Eine Möglichkeit ist die Charakterisierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen.

Das Konzept der Peptidsynthese an Zellulosemembranen wurde erstmalig von R. Frank (Frank *et al.*, 1988) und später von J. Eichler (Eichler *et al.*, 1991) beschrieben und wird schematisch in Abb. 3.1 gezeigt. Das Prinzip der SPOT-Technologie basiert auf der gezielten Synthese von Peptiden auf definierten Positionen (SPOTs) einer Zellulosemembran. Die Aminosäuren reagieren mit den oberflächengebundenen funktionellen Gruppen und initiieren dann eine konventionelle Peptidsynthese. Je nach Format können zahlreiche Moleküle parallel synthetisiert werden.

Sämtliche Peptidarrays wurden vollautomatisch unter der Leitung von Frau Dr. Ester in der Arbeitsgruppe von Dr. Uetz im Forschungszentrum Karlsruhe am Institut für Toxikologie und Genetik synthetisiert. Dazu wurden die Sequenzen des Androgenrezeptors und der C-SH2-Domäne der p85-Untereinheit der PI3-Kinase als Peptide auf eine aktivierte Zellulosemembran (*Amino-PEG<sub>500</sub>-UC540-Membran*, INTAVIS AG, *Bioanalytical Instruments*) gespottet. Als Positivkontrolle diente ein Epitop der Glutathion-S-Transferase (GST) (Kontrollpeptid: QRALAKDLIVPRRP), was ebenfalls als Spot aufgetragen wurde. Die Peptide bestanden aus 15 Aminosäuren der zu testenden Sequenz, wobei die folgenden Peptide jeweils um drei Aminosäuren verschoben wurden. Dies wurde solange fortgesetzt, bis die gesamte Sequenz auf diese Weise auf eine Membran gespottet war.

Anschließend konnte die Membran mit den gebundenen Peptiden auf Interaktion mit dem zu testenden zweiten Protein überprüft werden. Im Folgenden wurde die Zellulosemembran für 10 min in Methanol inkubiert und anschließend dreimal für jeweils 10 min in TBS-Puffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl; pH 8,0) gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 3 h in Blockierungspuffer (TBS (20 mM Tris, 150 mM NaCl; pH 8,0) mit 2 % Magermilchpulver und 5 % Saccharose) inkubiert und einmal für 10 min in TBS-Puffer gewaschen. Nun wurde die Zellulosemembran mit dem zu testenden zweiten Protein in Form eines GST-Fusionsproteins (5 - 10 µg/ml) im Blockierungspuffer über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert.



### 3.2.7 Identifizierung einzelner interagierender Aminosäuren durch Substitution gegen Alanin (*Alanin-Scan*)

Zur genaueren Identifizierung der interagierenden Aminosäuren wurden die Peptide ausgewählt, die im vorangegangenen Peptidarray (s. Kapitel 3.2.6) bereits eine positive Interaktion zeigten. In diesem Peptidarray wurde jede Position auf dem Peptid einmal durch Alanin substituiert (Cunningham *et al.*, 1989), wobei pro Peptid immer nur eine Aminosäure gegen Alanin ausgetauscht wurde. Das Prinzip des *Ala-Scans* ist schematisch in Abb. 3.2 dargestellt. Durch Substitution einzelner Aminosäuren mit Alanin, der einfachsten chiralen Aminosäure, können Aussagen getroffen werden, welche Aminosäuren an der Interaktion beteiligt sind. Die Hybridisierung der Zellulosemembran mit dem zu testenden Protein erfolgte wie unter Kapitel 3.2.6 beschrieben.

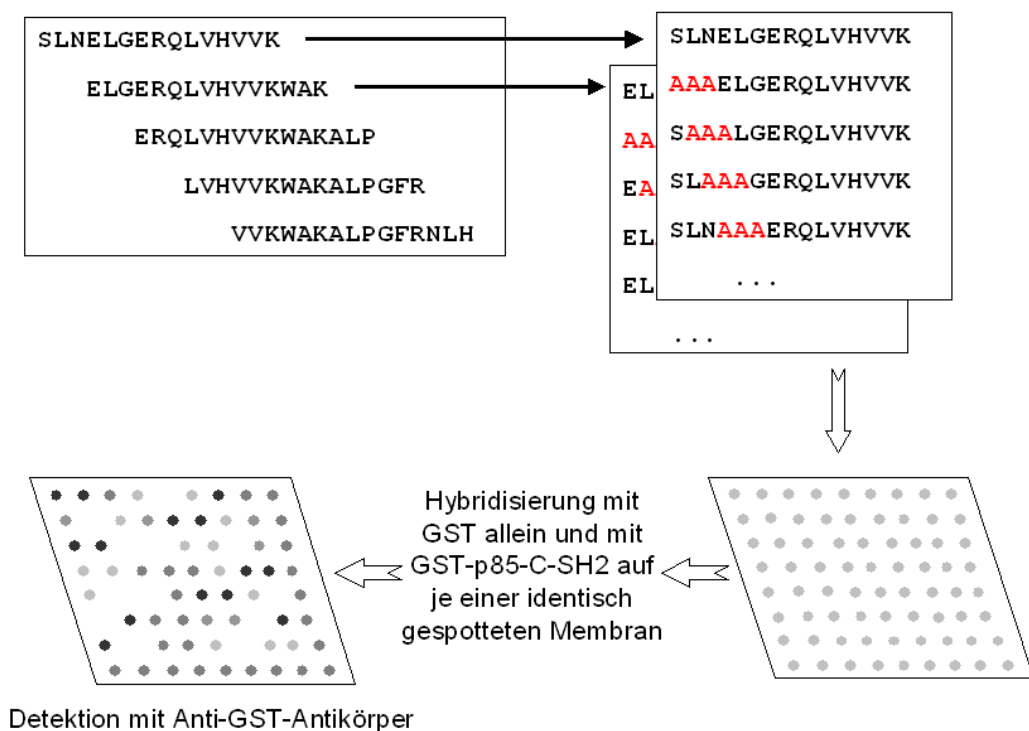


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Durchführung einer Alanin-Substitution.

### 3.2.8 Bakterien-Methoden

#### 3.2.8.1 Einfrieren von Bakterien

Die Bakterienkulturen wurden für 16 h bei 37 °C schüttelnd kultiviert und im Verhältnis 90 % LB-Medium (1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl) und 10 % DMSO bei -80 °C eingefroren.

#### 3.2.8.2 Herstellung von Selektivagarplatten

Zu 1 L frisch angesetzttem LB-Medium (1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl) wurde 1,5 % Bacto-Agar hinzugegeben. Nach Autoklavieren und Abkühlen auf 45 °C erfolgte die Zugabe des jeweiligen Antibiotikums. Durch Überstreichen der Platten mit einer Bunsenbrennerflamme können Luftblasen entfernt werden. Nach Erstarren des Agars wurden die Platten bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C für maximal sechs Wochen gelagert.

### 3.2.9 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden in einem Labor der Sicherheitsstufe S1 an einer Sterilbank (*Klasse II; Thermo Elektron Corporation, Dreieich*) durchgeführt. Die Zelllinien wurden bei 37 °C, 5 - 6 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit in Zellkulturschalen oder -flaschen (*Greiner Bio-One, Frickenhausen*) kultiviert.

#### 3.2.9.1 Passagieren von Zellen

Bei allen verwendeten Zelllinien handelte es sich um adhärent wachsende Zellen. Die Zellen wurden bis zum Erreichen einer Zelldichte von 80 - 90 % Konfluenz im entsprechenden Zellkulturmedium kultiviert. Nachfolgend wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) gewaschen und mit einer 0,25 %igen Trypsinlösung von der Kulturschale abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Kulturmedium (vorgewärmt auf 37 °C) aufgenommen und in der gewünschten Verdünnung in neue Zellkulturschalen ausgesät.

### 3.2.9.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen wie unter 3.2.9.1 beschrieben trypsiniert und für 3 min bei 900 rpm abzentrifugiert. Die Zellen wurden in Einfriermedium (DMEM oder RPMI 1640, 10 % FBS, 10 % DMSO) resuspendiert, in Kryoröhrchen (*Greiner Bio-One, Frickenhausen*) aliquotiert und zunächst bei -80 °C gelagert. Später wurden die Kryoröhrchen zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum schnellstmöglichen Auftauen von Zellen wurden diese nach der Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff bei 37 °C aufgetaut, mit Kulturmedium versetzt, 3 min bei 900 rpm abzentrifugiert und in frischem Kulturmedium zur weiteren Kultivierung resuspendiert.

### 3.2.10 Transfektion eukaryontischer Zellen

#### 3.2.10.1 Transiente Transfektion von siRNA mit *HiPerFect Transfection Reagent*

Am Tag vor der Transfektion wurden  $4,5 \times 10^5$  22Rv1 Zellen auf Zellkulturschalen (d=60 mm) ausgesät. Kurz vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Anschließend wurde pro Kulturschale die entsprechende Menge siRNA-Lösung (Endkonzentration: 75 nM für Akt1/Akt2) in 100 µl serumfreiem RPMI 1640 Kulturmedium gelöst. Die Kontroll-siRNA (GFP) wurde in der gleichen Konzentration wie die zu untersuchende siRNA eingesetzt. Weiterhin wurden zu jedem Transfektionsansatz 20 µl *HiPerFect Transfection Reagent* (*Qiagen, Hilden*) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 - 10 min bei RT, die der Bildung von Oligonukleotid-*HiPerFect*-Komplexen diente, wurde in jede Zellkulturschale 100 µl dieses Transfektionsgemisches tropfenweise auf die Zellen gegeben und durch vorsichtiges Schwenken gemischt. 48 h nach der Transfektion wurde das Kulturmedium durch frisches RPMI 1640 Medium ohne Phenolrot mit 3 % CCS (*Charcoal/Dextran treated FBS*) (*Perbio, Bonn*) ausgetauscht und die 22Rv1 Zellen daraufhin nochmals wie oben beschrieben transfiziert. Nach weiterer Inkubation von 24 h unter den normalen Wachstumsbedingungen (s. Kapitel 3.2.9) wurden die Zellen mit IGF-I (20 ng/ml) oder

Ethanol behandelt und nochmals für 24 h kultiviert. Nach insgesamt 96 h Inkubation wurden die Zellen geerntet (s. Kapitel 3.2.4.1) und durch *Western blot*-Analyse (s. Kapitel 3.2.4.5) überprüft.

### 3.2.10.2 Transiente Transfektion mit *FuGENE*<sup>®</sup> 6 für *Western blot*-Analyse

Für *Western blot*-Analysen der Androgenrezeptormutanten wurden DU145 und PC-3 Zellen mit *FuGENE*<sup>®</sup> 6 *Transfection Reagent* (Roche Diagnostics, Mannheim) transient transfiziert. Dazu wurden  $4 \times 10^5$  Zellen pro Zellkulturschale (d=10 cm) am Tag vor der Transfektion ausgesät. Nach einem Mediumwechsel von RPMI 1640 mit Phenolrot und 10 % FBS zu RPMI 1640 ohne Phenolrot (Invitrogen, Karlsruhe) mit 3 % CCS (*Charcoal/Dextran treated FBS*) (Perbio, Bonn) erfolgte die Transfektion. Pro Transfektionsansatz wurden 3 µg Plasmid-DNA vom Androgenrezeptor bzw. den Androgenrezeptor-Mutanten und 15 µl *FuGENE*<sup>®</sup> 6-Reagenz verwendet, welches in 500 µl serumfreiem Medium 5 min bei RT inkubiert wurde. Nachfolgend wurde die *FuGENE*<sup>®</sup> 6-Lösung zur vorpipettierten DNA gegeben und für weitere 15 min bei RT inkubiert. Anschließend konnte das Transfektionsgemisch tropfenweise zu den Zellen gegeben werden. Die Induzierung der Zellen mit IGF-I (20 ng/ml), EGF (10 ng/ml), IL-6 (20 ng/ml) oder dem Lösungsmittel erfolgte 24 h nach der Transfektion. Das Ernten der Zellen wurde nach weiteren 24 h mit anschließender *Western blot*-Analyse (s. Kapitel 3.2.4.5) durchgeführt.

### 3.2.10.3 Transiente Transfektion mit *FuGENE*<sup>®</sup> 6 für die Luziferase-Reportergen-Analyse

Für die Transfektion mit *FuGENE*<sup>®</sup> 6-Reagenz wurden DU145 Zellen am Tag zuvor trypsinisiert und pro Transfektionsansatz  $1,5 \times 10^5$  Zellen in eine 6-well-Zellkulturplatte transferiert. Am Tag der Transfektion erfolgte zunächst ein Mediumwechsel zu RPMI 1640 Medium mit 3 % CCS (*Charcoal/Dextran treated FBS*) (Perbio, Bonn). Anschließend wurden pro Ansatz 1 µg *Photinus pyralis*-Luziferase-Reportergen-Plasmid (pGL3 MMTV-luc), 0,2 µg *Renilla reniformis*-Luziferase-Expressionsvektor (pTK Renilla-luc) und 0,05 µg Plasmid-DNA des Androgenrezeptor bzw. der Androgenrezeptor-Mutanten vorgelegt. Die ent-



sprechende Menge *FuGENE*<sup>®</sup>6-Reagenz (3 µl *FuGENE*<sup>®</sup>6 pro 1,25 µg DNA) wurde in 100 µl serumfreiem Medium gelöst. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die *FuGENE*<sup>®</sup>6-Lösung zur vorpipettierten DNA gegeben und für weitere 15 min bei RT inkubiert. Anschließend konnte das Transfektionsgemisch tropfenweise auf die Zellen gegeben werden. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit DHT ( $10^{-7}$  M), IGF-I (20 ng/ml) oder dem Lösungsmittel behandelt. Das Ernten der Zellen erfolgte nach weiteren 24 h mit anschließender Messung der Luziferase-Aktivität (s. Kapitel 3.2.11.1, 3.2.11.2 und 3.2.11.3).

### 3.2.10.4 Stabile Transfektion

Die stabile Transfektion der L6 Skelettmuskelzelllinie mit dem Androgenrezeptor-Wildtyp (pSG5ARwt) wurde mit Hilfe von *FuGENE*<sup>®</sup>6 *Transfection Reagent* (Roche Diagnostics, Mannheim) (s. Kapitel 3.2.10.2) durchgeführt. Da auf diesem Plasmid kein geeigneter Selektionsmarker vorhanden ist, wurde eine Cotransfektion mit dem Plasmid pSV2neo, welches die Neomycin-Resistenz trägt, durchgeführt. Hierfür wurde das Plasmid pSG5ARwt in 10-fachem Überschuss eingesetzt, da es die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass eine transfizierte Zelle nicht nur mit dem Selektionsmarker transfiziert wurde, sondern auch mit pSG5ARwt.

24 h nach der Transfektion wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Die Selektion der Zellklone, welche stabil das transfizierte Konstrukt aufgenommen hatten, erfolgte durch Zugabe des Antibiotikums G-418 (*PAA Laboratories, Cölbe*) in der in Vorversuchen getesteten letalen Dosis für L6 Muskelzellen (600 µg/ml), die das transfizierte Konstrukt nicht aufgenommen hatten. Die resistenten Zellklone wurden trypsiniert und in frisches Selektionsmedium überführt, wobei eine sogenannte Massenkultur, durch das Mischen der stabilen Klone, entstand. Durch *Western blot*-Analyse (s. Kapitel 3.2.4.5) wurde die stabile Zelllinie auf die Expression des gewünschten Proteins untersucht. Das Selektionsmedium wurde für die gesamte Kultivierungsdauer der Zellen beibehalten.

### 3.2.11 Analyse der Genexpression durch Messung der Luziferaseaktivität

Die Messung der Luziferaseaktivität beruht auf der Lumineszenz (Lichtemission), die durch eine spezielle biochemische Reaktion hervorgerufen wird. Das Enzym Luziferase kommt in der nordamerikanischen Feuerfliege *Photinus pyralis* vor. Es katalysiert die Reaktion zwischen ATP und dem Substrat Luziferin und produziert dabei Licht. Die enzymabhängige Lichtemission stellt ein direktes Maß für die Aktivität der untersuchten Genregulationselemente dar.

#### 3.2.11.1 Luziferase-Reportergen-Analyse

Die transient mit einem *Photinus pyralis*-Luziferase-Reportergen-Plasmid (pGL3 MMTV-luc), *Renilla reniformis*-Luziferase-Expressionsvektor (pTK Renilla-luc) und den Androgenrezeptor-Konstrukten cotransfizierten DU145 Zellen (s. Kapitel 3.2.10.3) wurden 24 h nach ihrer Behandlung mit DHT ( $10^{-7}$  M), IGF-I (20 ng/ml) oder dem Lösungsmittel einmal mit kaltem PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) gewaschen, 300  $\mu\text{l}$  1x *Passive Lysis Buffer* (*Promega, Mannheim*) zugegeben und für 15 min unter gelegentlichem Schwenken bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im Lysispuffer in ein gekühltes Reaktionsgefäß überführt.

#### 3.2.11.2 Messung der *Photinus pyralis*-Luziferase-Aktivität

Zur Bestimmung der Luziferase-Enzymaktivität wurden 50  $\mu\text{l}$  des geernteten Zellextraktes in eine Mikrotiterplatte überführt. Die Messung erfolgte am Luminometer 1420 *Luminescence Counter VICTOR<sup>TM</sup>Light* (*PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim*) unter Zugabe von 70  $\mu\text{l}$  autoinjizierter Luziferin-Lösung (Luziferin-Stocklösung: 1 mM Luziferin (0,28 mg/ml), 1:5 Verdünnung mit GlyGly-Puffer (25 mM GlyGly, 15 mM  $\text{MgSO}_4$ , 4 mM EGTA; pH 7,8)) und 100  $\mu\text{l}$  Luziferase-Reaktionspuffer (2 mM ATP, 1 mM DTT in GlyGly-Puffer). Es wurden immer Dreifachbestimmungen durchgeführt. Als Referenzwert wurden 50  $\mu\text{l}$  des 1x Lysispuffers (*Promega, Mannheim*) verwendet.

### 3.2.11.3 Messung der *Renilla reniformis*-Luziferase-Aktivität

Zur Normalisierung der Messwerte bezüglich Zellzahl und Transfektions-effizienz wurde bei allen Transfektionen der *Renilla reniformis*-Luziferase-Expressionsvektor (pTK Renilla-luc) cotransfiziert. Dabei wurden nochmals 50 µl Zelllysate (s. Kapitel 3.2.11.1) in eine Mikrotiterplatte gegeben. Unter Zugabe von Coelenterazin-Puffer (0,1 M KPi-Puffer (0,2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; pH 7,6), 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA; pH 7,6) und Coelenterazin-Substratlösung (Endkonzentration: 25 nM Coelenterazin) erfolgte die Messung der *Renilla*-Luziferase-Aktivität am Luminometer 1420 Luminescence Counter VICTOR<sup>TM</sup>Light (PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim). Als Referenzwert diente auch hier der 1x Lysispuffer (Promega, Mannheim).



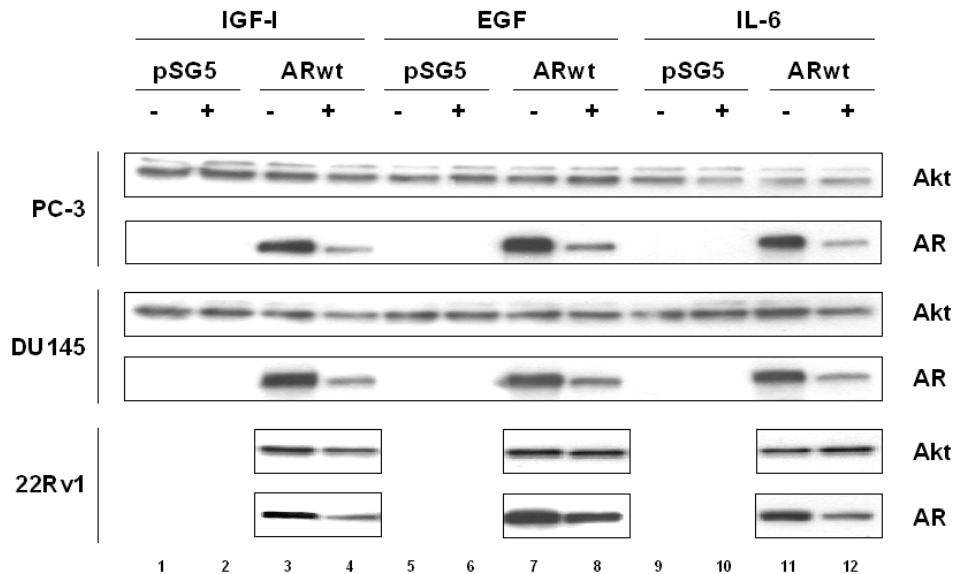
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf den Androgenrezeptor

Eine Reihe von Mechanismen wurden identifiziert, die zur Progression von androgensensitivem zu androgenunabhängigem Prostatakrebs führen. Eine bedeutende Rolle bei hormonrefraktären Prostatakarzinomen wird dabei dem Einfluss der Wachstumsfaktoren zugeschrieben. In fortgeschrittenem, hormonunabhängigem und metastasierendem Prostatakrebs sind EGF (*epidermal growth factor*), TGF $\alpha$  (*transforming growth factor  $\alpha$* ), KGF (*keratinocyte growth factor*), bFGF (*basic fibroblast growth factor*) und IGF-I (*insulin-like growth factor*) und deren entsprechende Rezeptoren überexprimiert (Culig *et al.*, 1994, 2000, 2002). Die erhöhte Wachstumsfaktor- und Rezeptor-Expression wird als Ursache für eine androgenunabhängige Progression von Prostatakrebs genannt, da in mehreren Studien bereits eine Beeinflussung von Wachstumsfaktorsignalwegen auf die Androgenrezeptor-Aktivität gezeigt werden konnte.

#### 4.1.1 Effekt von IGF-I, EGF und IL-6 auf den Androgenrezeptor in verschiedenen Prostatakrebszelllinien

Um zu zeigen, welchen Einfluss Wachstumsfaktoren, wie IGF-I, EGF und das Zytokin IL-6 auf den Androgenrezeptor besitzen, wurden verschiedene Prostatakrebszelllinien mit diesen Wachstumsfaktoren behandelt. Die PC-3 und DU145 Prostatakrebszellen, die keine Expression des Androgenrezeptors aufweisen, wurden mit Hilfe des Transfektionsreagenzes *FuGENE*<sup>®</sup>6 (Roche Diagnostics, Mannheim) mit dem Androgenrezeptor-Wildtyp (pSG5ARwt) oder dem Leervektor (pSG5) transient transfiziert. Die Prostatakrebszelllinie 22Rv1 exprimiert den Androgenrezeptor endogen. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit IGF-I (20 ng/ml), EGF (10 ng/ml) und IL-6 (20 ng/ml) für weitere 24 h kultiviert. Nachfolgend wurden die Zellen geerntet, lysiert und das Gesamtzelllysat im *Western-blot* mit einem Androgenrezeptor-Antikörper analysiert (s. Abb. 4.1).

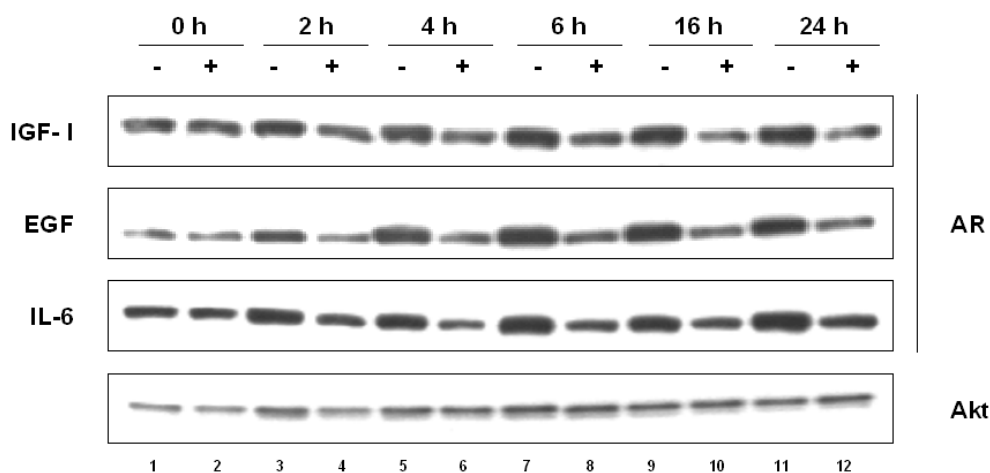


**Abb. 4.1: Effekt von IGF-I, EGF und IL-6 auf den Androgenrezeptor in den Prostatakrebszelllinien PC-3, DU145 und 22Rv1.** Die Prostatakarzinomzelllinien PC-3 und DU145, die keine Expression des Androgenrezeptors aufweisen, wurden mit Hilfe des Transfektionsreagenzes *FuGENE*<sup>®</sup>6 (Roche Diagnostics, Mannheim) mit dem Androgenrezeptor-Wildtyp (pSG5ARwt) oder dem Leervektor (pSG5) transient transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit IGF-I (20 ng/ml), EGF (10 ng/ml) und IL-6 (20 ng/ml) (gekennzeichnet mit +) oder nur mit dem Lösungsmittel (gekennzeichnet mit -) für weitere 24 h kultiviert. Nachfolgend wurden die Zellen geerntet, lysiert und das Gesamtzelllysat im *Western-blot* analysiert. Die Detektion des Androgenrezeptor-Proteins wurde mit einem Androgenrezeptor-Antikörper und die Ladekontrolle der Gesamtproteinmenge mit einem Akt-Antikörper durchgeführt.

Sowohl die den Androgenrezeptor endogen exprimierenden 22Rv1 Zellen als auch die transient mit dem Androgenrezeptor-Wildtyp transfizierten PC-3 und DU145 Zellen wiesen eine signifikante Reduzierung der Androgenrezeptor-Proteinmenge auf. Dabei war kein Unterschied zwischen den verwendeten Wachstumsfaktoren IGF-I, EGF und IL-6 hinsichtlich der Reduzierung des Androgenrezeptor-Proteins (Vergleich Spur 3 und 4 für IGF-I, Spur 7 und 8 für EGF und Spur 11 und 12 für IL-6) festzustellen. Ein durch die transiente Transfektion hervorgerufener Effekt konnte durch die Verwendung der Prostatakarzinomzelllinie 22Rv1, die eine endogene Expression des Androgenrezeptors aufweist, ausgeschlossen werden.

#### 4.1.2 Zeitlicher Verlauf der Androgenrezeptor-Degradation

Des Weiteren wurde der Zeitfaktor, ab wann es zur Herabsetzung der Androgenrezeptor-Proteinmenge kommt, untersucht. Hierfür wurden 22Rv1 Zellen für 0, 2, 4, 6, 16 und 24 Stunden mit den einzelnen Wachstumsfaktoren IGF-I, EGF und IL-6 kultiviert, anschließend geerntet und lysiert. Die Zellextrakte wurden mit Hilfe eines Androgenrezeptor-Antikörpers durch Verwendung des *Western-blot*-Verfahrens analysiert (s. Abb. 4.2).



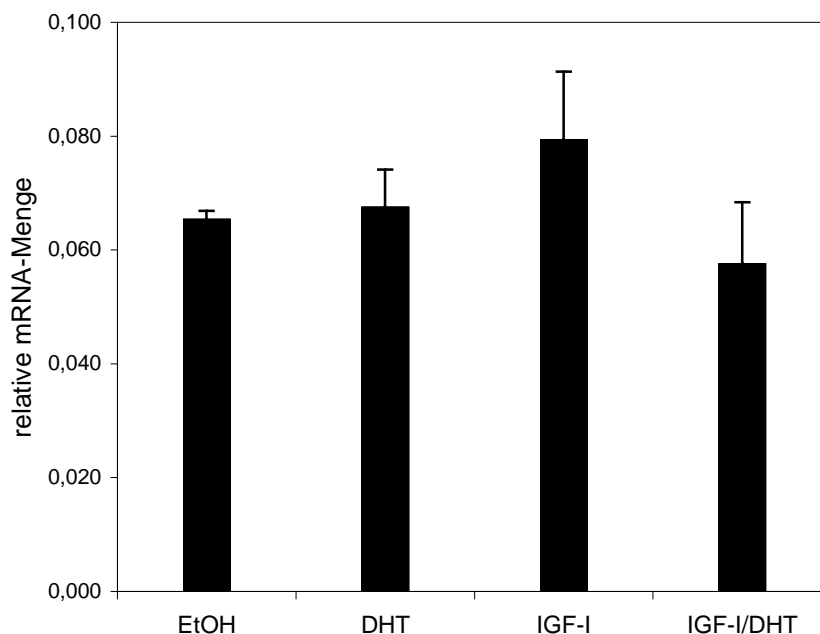
**Abb. 4.2: Effekt der Wachstumsfaktoren IGF-I, EGF und IL-6 auf die Proteinmenge des Androgenrezeptors in 22Rv1 Zellen.** 22Rv1 Zellen wurden mit den Wachstumsfaktoren IGF-I (20 ng/ml), EGF (10 ng/ml) und IL-6 (20 ng/ml) (gekennzeichnet mit +) oder nur mit dem Lösungsmittel (gekennzeichnet mit -) für 0, 2, 4, 6, 16, und 24 h behandelt. Nachfolgend wurden die Zellen geerntet, lysiert und das Gesamtzelllysate im *Western-blot* analysiert. Die Detektion des Androgenrezeptors wurde mit einem Androgenrezeptor-Antikörper und die Ladekontrolle der Gesamtproteinmenge mit einem Akt-Antikörper durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigten, dass bereits eine zweistündige Inkubation der 22Rv1 Zellen mit IGF-I, EGF und IL-6 zu einer deutlichen Reduzierung des Androgenrezeptor-Proteins führte. Je länger die Zellen mit den Wachstumsfaktoren kultiviert wurden, desto ausgeprägter trat dieser Effekt hervor. Sowohl IGF-I als auch EGF und IL-6 zeigten im gleichen Maße die Reduzierung des Rezeptor-Proteins.

Um die Herunterregulierung des Androgenrezeptor-Proteins genauer zu untersuchen, wurden die nachfolgenden Experimente hauptsächlich mit IGF-I durchgeführt.

#### 4.1.3 Einfluss von IGF-I auf die Expression des Androgenrezeptors

Aus den vorliegenden Ergebnissen stellte sich die Frage, ob die beobachtete Reduzierung der Androgenrezeptormenge auf Proteinebene oder bereits auf mRNA-Level erfolgt. Mit Hilfe der quantitativen *Real-time* PCR wurde die Expression des Androgenrezeptor-Gens in der Prostatakrebszelllinie 22Rv1, welche den Androgenrezeptor endogen exprimiert, untersucht. Hierfür wurden 22Rv1 Zellen für 24 Stunden in Gegenwart von DHT, IGF-I oder der Kombination IGF-I/DHT kultiviert und anschließend geerntet. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und durch *Real-time* PCR mit dem *ABI Prism Sequence Detection System 7000* (*Applied Biosystems, Darmstadt*) analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 4.3 dargestellt.



**Abb. 4.3: Einfluss von IGF-I auf die Expression des Androgenrezeptor-Gens in der Prostatakrebszelllinie 22Rv1.** 22Rv1 Zellen wurden für 24 h mit IGF-I (20 ng/ml), DHT ( $10^{-7}$  M) und beides in Kombination IGF-I/DHT oder nur mit dem Lösungsmittel behandelt. Nach Isolation der Gesamt-RNA wurde diese durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und mittels *Real-time* PCR analysiert. Die Ct-Werte der Androgenrezeptor-Expression wurden mit Hilfe des *housekeeping*-Genes Rib36B4 (Ribosomale Untereinheit Rib36B4) normalisiert. Zusätzlich wurde ein *no template control* (NTC)-Ansatz ohne cDNA mitgeführt, um die Reinheit



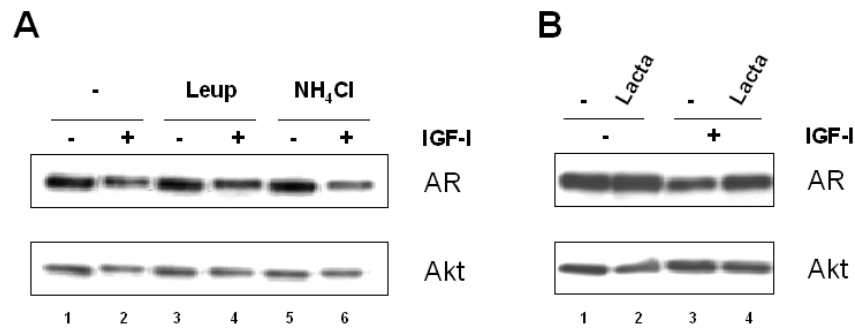
der verwendeten Komponenten zu prüfen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen *Real-time* PCR-Durchläufen.

Die Ergebnisse der *Real-time* PCR demonstrieren, dass weder IGF-I noch DHT oder beides in Kombination Einfluss auf die Expression des Androgenrezeptors besitzen. Der leicht erhöhte Wert mit IGF-I weist keine statistische Signifikanz auf. Demnach erfolgt die Reduzierung des Androgenrezeptors ausschließlich auf Proteinebene.

### **4.1.4 Untersuchungen zum Abbauweg des Androgenrezeptor-Proteins**

Der Abbau intrazellulärer Proteine besitzt einen regulatorischen Einfluss auf zelluläre Prozesse, wie z.B. Zellzyklus, Zellteilung oder den kontrollierten Abbau von missgefalteten und anormalen Proteinen (Ciechanover *et al.*, 2000). Die Degradation von Proteinen in eukaryontischen Zellen findet hauptsächlich über zwei Systeme, den lysosomalen Abbau und den Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System, statt (Pillay *et al.*, 2002; Hilt und Wolf, 2004). Um zu überprüfen, auf welche Weise die Degradation des Androgenrezeptors realisiert wird, wurde sowohl der lysosomale als auch der proteasomale Proteinabbauweg unter Verwendung verschiedener Enzym-Inhibitoren blockiert und analysiert. Zur Hemmung der Lysosomen-Aktivität wurden die Substanzen Leupeptin, ein Inhibitor lysosomaler Serin-Cystein-Proteinasen, und Ammoniumchlorid genutzt (Kuramochi *et al.*, 1979). Für die Inhibierung des Proteinabbaus über das Ubiquitin-Proteasom-System wurde Lactacystin, ein spezifischer proteasomaler Inhibitor, der durch irreversible Bindung an das katalytische Zentrum des Proteasoms die Hemmung der Proteaseaktivität des Multienzymkomplexes herbeiführt, verwendet (Fenteany *et al.*, 1998).

Die in Anwesenheit von Leupeptin (Leup), Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl) oder Lactacystin (Lacta) mit IGF-I behandelten 22Rv1 Zellen wurden geerntet und durch *Western-blot*-Analyse ausgewertet.



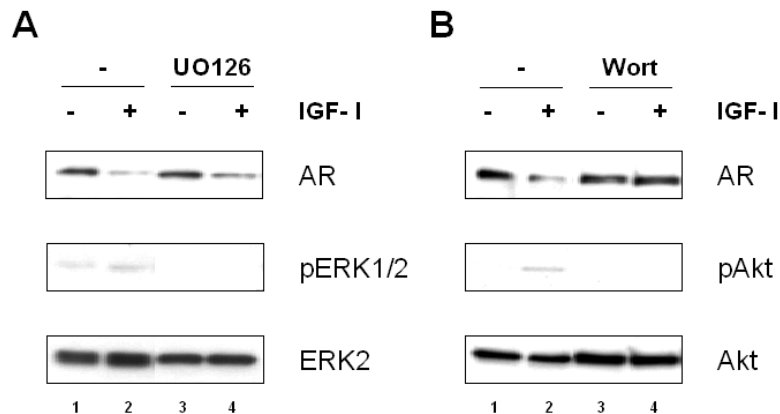
**Abb. 4.4: Untersuchung des vermittelnden Proteinabbauweges der IGF-I-induzierten Degradation des Androgenrezeptors. (A)** 22Rv1 Zellen wurden für 20 min mit Leupeptin (Leup, 10  $\mu$ M), Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM) oder nur mit dem Lösungsmittel behandelt. Nach der Behandlung der Zellen mit IGF-I (20 ng/ml) für weitere 4 h wurden die Zellen geerntet und lysiert. Das Gesamtzelllysate wurde mittels *Western-blot*-Analyse und einem spezifischen Androgenrezeptor-Antikörper und einem Akt-Antikörper als Kontrolle analysiert. **(B)** 22Rv1 Zellen wurden für 1 h mit Lactacystin (Lacta, 10  $\mu$ M) behandelt und anschließend mit IGF-I (20 ng/ml) für weitere 4 h kultiviert. Die weitere Durchführung des Experimentes erfolgte wie unter (A) beschrieben.

Die in Abbildung 4.4A (Spur 3 bis 6) dargestellten Ergebnisse zeigen keine Auswirkungen der verwendeten Lysosomen-Inhibitoren Leupeptin und Ammoniumchlorid auf die IGF-I-vermittelte Reduktion des Androgenrezeptor-Proteins. Nach Behandlung der Zellen mit dem proteasomalen Inhibitor Lactacystin und einer anschließenden IGF-I-Zugabe konnte hingegen keine Degradation des Androgenrezeptor-Proteins mehr festgestellt werden (Abb. 4.4B Spur 3 und 4). Demnach erfordert die negative Regulation der Androgenrezeptor-Proteinmenge durch IGF-I die enzymatische Aktivität des Proteasom-abhängigen Proteinabbauweges und weist damit auf einen IGF-I-induzierten proteasomalen Abbau des Androgenrezeptors hin.

#### 4.1.5 Überprüfung des vermittelnden Signaltransduktionsweges

Die IGF-I-Signaltransduktion wird zum einen über den Ras/Raf/MAP-Kinase- und zum anderen über den PI3-Kinase-Weg vermittelt (Kadowaki *et al.*, 1996; Lopaczynski, 1999). Zur Untersuchung, welcher Signaltransduktionsweg in die IGF-I-vermittelte Degradation des Androgenrezeptors involviert ist, wurden spezifische Inhibitoren dieser Signaltransduktionswege verwendet. Als Inhibitor

für den MAP-Kinase-Signalweg diente der MEK-Inhibitor UO126 und für die Hemmung des PI3-Kinase-Signalweges wurde Wortmannin (Wort) eingesetzt. Vor der IGF-I-Behandlung der 22Rv1 Zellen wurden diese für 30 min mit dem jeweiligen Inhibitor bzw. dem entsprechenden Lösungsmittel versetzt.



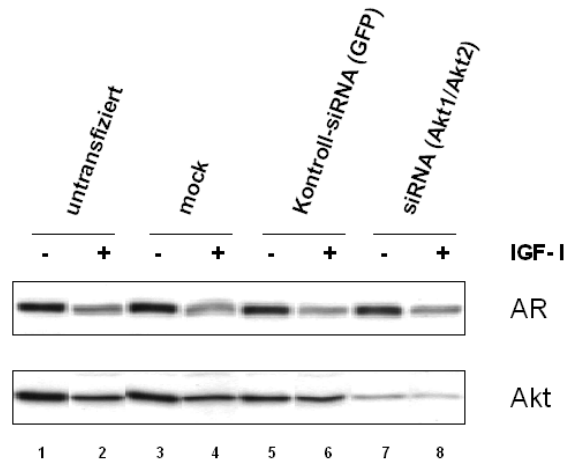
**Abb. 4.5: Untersuchung des vermittelnden Signaltransduktionsweges der IGF-I-induzierten Degradation des Androgenrezeptors. (A)**  $1,5 \times 10^6$  22RV1 Zellen wurden für 30 min mit dem MEK-Inhibitor UO126 (10  $\mu$ M) oder DMSO behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit IGF-I (20 ng/ml) induziert und für weitere 4 h kultiviert. Die Gesamtzelllysate wurden mittels Immunoblot-Verfahren analysiert, wobei ein Androgenrezeptor-Antikörper, ein phospho-ERK1/2-Antikörper und zusätzlich als Ladekontrolle ein ERK2-Antikörper verwendet wurden. **(B)** Wie unter (A) beschrieben, wurden ebenfalls  $1,5 \times 10^6$  22RV1 Zellen für 30 min diesmal mit dem PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin (Wort, 0,1  $\mu$ M) oder DMSO behandelt. Anschließend wurden auch in diesem Experiment die Zellen mit IGF-I (20 ng/ml) versetzt und für weitere 4 h kultiviert. Die Gesamtzelllysate wurden mittels Immunoblot-Verfahren analysiert, wobei ein Androgenrezeptor-Antikörper, ein phospho-Akt(Ser473)-Antikörper und zusätzlich als Ladekontrolle ein Akt-Antikörper verwendet wurden.

Durch Immunoblot-Analyse der Proteinextrakte mit dem Androgenrezeptor-Antikörper konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung der PI3-Kinase durch den verwendeten Inhibitor Wortmannin den Androgenrezeptor-Proteinabbau verhindert. Während die Vorbehandlung der 22Rv1 Zellen mit dem MEK-Inhibitor UO126 nach wie vor eine Reduzierung des Androgenrezeptor-Proteins aufweist (Vergleich Spur 3 und 4 mit Androgenrezeptor-Antikörper in Abb. 4.5A) ist durch die Behandlung der Zellen mit dem PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin die IGF-I-induzierte Degradation ausgeblieben (Vergleich Spur 3 und 4 mit Androgenrezeptor-Antikörper in Abb. 4.5B). Die Funktionalität der verwendeten

Inhibitoren zeigte sich in Abbildung 4.5A und 4.5B in Spur 3 und 4, da weder die Phosphorylierung von ERK1/2 noch von Akt mehr nachweisbar war. Die Ergebnisse der Inhibitor-Experimente zeigen, dass die negative Regulation des Androgenrezeptors durch IGF-I infolge der Inhibierung der PI3-Kinase aufgehoben wird, was die Involvierung der PI3-Kinase verdeutlicht.

#### **4.1.6 Rolle von Akt bei der Wachstumsfaktor-induzierten negativen Regulation des Androgenrezeptors**

Aufgrund der beobachteten Beteiligung des PI3-Kinase-Signalweges an der IGF-I-induzierten Reduzierung des Androgenrezeptors, stellte sich die Frage, durch welche Komponenten dieses Signalweges der Effekt hervorgerufen wird. Als Phosphoprotein wird der Androgenrezeptor über Phosphorylierung reguliert. Eine Phosphorylierung des Androgenrezeptors z.B. durch Akt erfolgt an den Positionen Ser-210 und Ser-790 und führt zur Ubiquitinierung und zum proteasomalen Abbau des Androgenrezeptors (Lin *et al.*, 2002). Eine Möglichkeit den Einfluss von Akt auf die Degradation des Androgenrezeptors zu untersuchen, stellt die Suppression von Akt mit Sequenz-spezifischen siRNAs dar. RNA-Interferenz (RNAi) hat sich zu einem wichtigen Werkzeug zum Studium von Genfunktionen entwickelt und ermöglicht den *Knock down* von Genen, d.h. die Sequenz-spezifische Unterdrückung der Expression einzelner Genprodukte auf posttranskriptioneller Ebene (Fire *et al.*, 1998). Der Mechanismus beruht auf dem Prozessieren von doppelsträngigen RNA-Molekülen, die als Oligonukleotide, sogenannte siRNAs (*small interfering RNA*), transfiziert werden (Elbashir *et al.*, 2001). Um die Frage beantworten zu können, ob Akt für die IGF-I-induzierte Herabsetzung des Androgenrezeptor-Proteins notwendig ist, wurden 22Rv1 Zellen mit siRNA gegen Akt1/Akt2 (Katome *et al.*, 2003) transient transfiziert und 24 h vor dem Ernten der Zellen mit IGF-I behandelt. Nach einer Kultivierung der 22Rv1 Zellen von insgesamt 96 h wurde das Zelllysate mittels *Western-blot*-Analyse untersucht (s. Abb. 4.6).



**Abb. 4.6: Einfluss der Suppression von Akt1/Akt2 durch siRNA auf die Degradation des Androgenrezeptor-Proteins.** Pro Ansatz wurden  $4,5 \times 10^5$  22Rv1 Zellen in Zellkulturschalen (d=60 mm) ausgesät. Die Transfektion der siRNA gegen Akt1/Akt2 und der Kontroll-siRNA (GFP) (Endkonzentration jeweils: 75 nM) erfolgte mit Hilfe von *HiPerFect Transfection Reagent* (Qiagen, Hilden). Nach 48 h erfolgte ein Mediumwechsel zu RPMI 1640 mit 3 % CCS und eine Nachtransfektion der Zellen. Für die letzten 24 h des Experimentes wurden die Zellen in Gegenwart von IGF-I (20 ng/ml) kultiviert. Nach insgesamt 96 h erfolgte das Ernten der Zellen und die Präparation der Proteinextrakte, die anschließend durch *Western-blot*-Analyse ausgewertet wurden. Zur Darstellung wurde ein spezifischer Androgenrezeptor- und Akt-Antikörper verwendet. Als Kontrollen wurden zusätzlich untransfizierte Zellen und Zellen, die nur mit dem Transfektionsreagenz transfiziert wurden (mock), mitgeführt.

Effekte, die auf eine unspezifische siRNA-Wirkung (Kontroll-siRNA, GFP) oder auf das verwendete Transfektionsreagenz (*mock*-Transfektion) zurückzuführen sind, konnten nicht beobachtet werden (Spuren 3 bis 6). Die Verwendung der siRNA gegen Akt1/Akt2 weist eine deutlich reduzierte Expression von Akt im Gegensatz zu untransfizierten Zellen auf (Vergleich Spuren 1 und 2 mit Spuren 7 und 8 unter Verwendung des Akt-Antikörpers). Im Vergleich zu allen mitgeführten Kontrollen konnte jedoch kein Einfluss von Akt auf die IGF-I-induzierte negative Regulation des Androgenrezeptors beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass trotz der Suppression von Akt1/Akt2 die IGF-I-vermittelte Degradation des Androgenrezeptors weiterhin erfolgt, was die Regulation des Abbauprozesses durch Akt damit ausschließt.

## 4.2 Interaktionsstudien zwischen PI3-Kinase und Androgenrezeptor

Die vorangegangenen Resultate zeigen, dass Akt keinen Einfluss auf die Degradation des Androgenrezeptors besitzt, was auf eine Regulation *upstream* von Akt und damit auf eine direkte Involvierung der PI3-Kinase hindeutet. Diese Vermutung wird zusätzlich durch die Verwendung des in Abbildung 4.5B gezeigten PI3-Kinase-spezifischen Inhibitors Wortmannin unterstützt. Die Vorbehandlung der 22Rv1 Zellen mit Wortmannin zeigte eine deutliche Inhibierung des Androgenrezeptor-Proteinabbaus. Eine Regulation durch die PI3-Kinase ist vor allem über eine direkte Bindung zum Androgenrezeptor denkbar, da eine Interaktion zwischen Androgenrezeptor und der p85-regulatorischen Untereinheit der PI3-Kinase bereits beschrieben wurde (Sun *et al.*, 2003; Baron *et al.*, 2004). Über welche Domänen bzw. Interaktionsstellen diese Bindung realisiert wird, gibt es jedoch unterschiedliche Auffassungen.

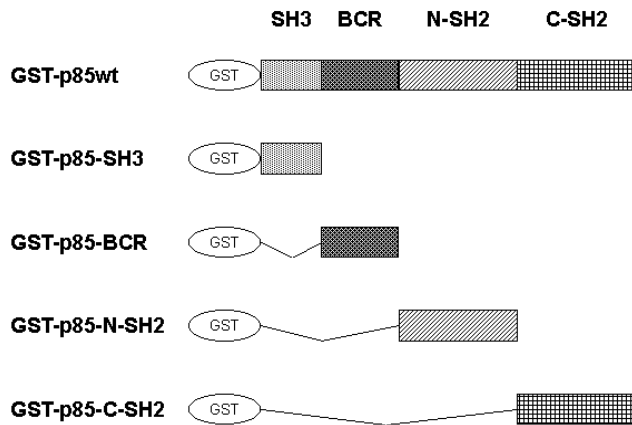
### 4.2.1 Bindungsverhalten zwischen verschiedenen Domänen der p85-Untereinheit der PI3-Kinase und dem Androgenrezeptor

Für die Überprüfung, welche Domäne der p85-Untereinheit der PI3-Kinase für die Interaktion mit dem Androgenrezeptor verantwortlich ist, wurden GST-Interaktionsstudien durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden verschiedene GST-Fusionskonstrukte verwendet, welche die einzelnen Domänen als auch die vollständige p85-Untereinheit der PI3-Kinase repräsentieren. Die regulatorische Untereinheit p85 besteht aus einer SH3-Domäne (*src homology 3*), einer BCR-Region (*breakpoint cluster region*) und zwei SH2-Domänen (*src homology 2*) (N- und C-SH2-Domäne) (Wymann und Pirola, 1998). Abbildung 4.7A zeigt eine schematische Darstellung der verwendeten GST-Fusionsproteine der p85-Untereinheit. Die GST-fusionierten p85-Konstrukte wurden an mit Sepharose immobilisiertes Glutathion gebunden und mit dem L-[<sup>35</sup>S]-markierten Androgenrezeptor-Wildtyp, der zuvor *in vitro* translatiert und für 10 min mit DHT oder dem Lösungsmittel behandelt wurde, inkubiert. Fand eine Interaktion statt, so konnte der radioaktiv markierte Androgenrezeptor durch Auftrennung in einem SDS-

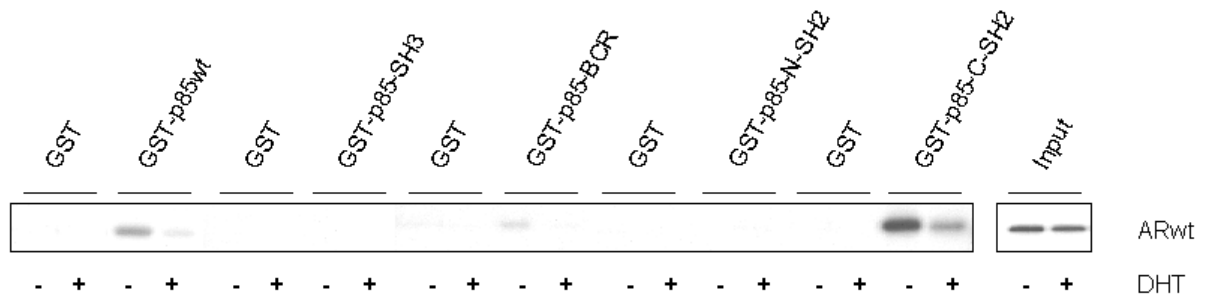
## Ergebnisse

Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) autoradiographisch detektiert werden (s. Abb.4.7B).

**A**



**B**



**Abb. 4.7: GST-Interaktionsstudien mit verschiedenen PI3-Kinase-Domänen und dem Androgenrezeptor. (A)** Schematische Darstellung der verwendeten GST-Fusionskonstrukte der p85-Untereinheit, welche die einzelnen Domänen (GST-p85-SH3, GST-p85-BCR, GST-p85-N-SH2 und GST-p85-C-SH2) als auch die vollständige p85-Untereinheit (GST-p85wt) repräsentieren. **(B)** Die bakteriell exprimierten GST-Fusionsproteine und GST als Negativkontrolle wurden an Glutathion-Sepharose gekoppelt und mit 10 µl *in vitro* translatiertem, radioaktiv markiertem Androgenrezeptor-Wildtyp (ARwt) inkubiert. Nach der *in vitro* Translation des ARwt wurde dieser zum einen mit DHT ( $10^{-7}$  M), zum anderen mit dem Lösungsmittel für 10 min behandelt. Der gebundene Androgenrezeptor wurde anschließend in einem 10 %igen Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) aufgetrennt und autoradiographisch detektiert. Für den Input wurde 1 µl der *in vitro* Transkription/Translation des ARwt eingesetzt.

Die Ergebnisse des GST-Interaktionsassays bestätigen die bereits bekannte Bindung des Androgenrezeptors mit der vollständigen p85-Untereinheit der PI3-Kinase (Sun *et al.*, 2003; Baron *et al.*, 2004). Bei der Untersuchung der

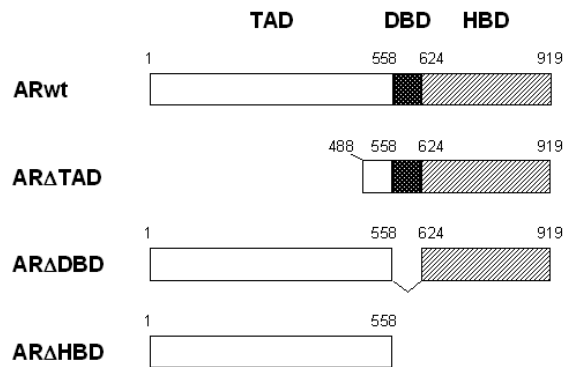
einzelnen Domänen der p85-Untereinheit konnte zusätzlich eine ausgeprägte spezifische Interaktion mit der p85-C-SH2-Domäne detektiert werden. Eine Bindung der p85-SH3-Domäne, wie sie durch Baron und Mitarbeiter beschrieben wurde (Baron *et al.*, 2004), konnte nicht festgestellt werden. Die bei Zugabe von DHT auftretende reduzierte Interaktion, sowohl mit der vollständigen p85-Untereinheit als auch mit der C-SH2-Domäne, kann mit der durch Hormonbindung hervorgerufenen Konformationsänderung des Androgenrezeptors erklärt werden (Wurtz *et al.*, 1996), die möglicherweise zu einer verringerten Bindungsintensität mit der p85-Untereinheit führt.

#### **4.2.2 Untersuchung verschiedener Androgenrezeptor-Deletionsmutanten auf Bindung mit der p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase**

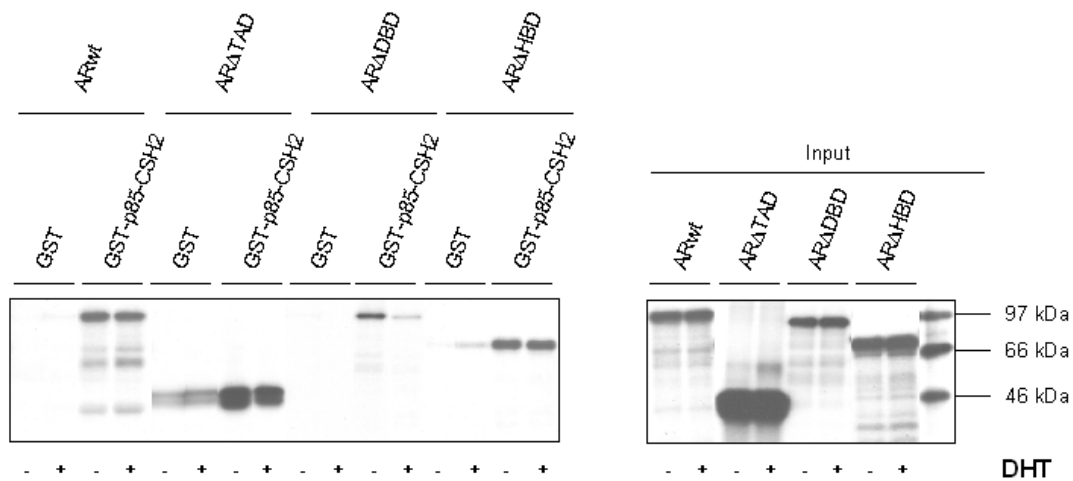
Zur vollständigen Kartierung der PI3-Kinase-Bindungsstelle an den Androgenrezeptor wurde die GST-fusionierte p85-C-SH2-Domäne mit verschiedenen *in vitro* translatierten L-[<sup>35</sup>S]-markierten Androgenrezeptor-Deletionsmutanten (s. Abb. 4.8A) getestet. Hierfür wurden drei unterschiedliche Androgenrezeptormutanten, welche die funktionellen Domänen repräsentieren benutzt: AR $\Delta$ TAD, ein Androgenrezeptor-Konstrukt mit einer Deletion des N-Terminus bis zur Aminosäure 488; AR $\Delta$ DBD, eine Mutante ohne DNA-Bindedomäne (von Aminosäure 558 bis 624) und AR $\Delta$ HBD, eine Androgenrezeptormutante, welche ausschließlich den N-Terminus bis Aminosäure 558 des Androgenrezeptors repräsentiert. Androgenrezeptor-Deletionsmutanten, die Bindung zur p85-C-SH2-Domäne aufwiesen, wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht (s. Abb. 4.8B).



**A**



**B**



**Abb. 4.8: GST-Interaktionsstudien mit verschiedenen Androgenrezeptor-Deletionsmutanten und der p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase. (A)** Schematische Darstellung der für die *in vitro* Translation eingesetzten Androgenrezeptor-Deletionsmutanten (ARΔTAD, ARΔDBD und ARΔHBD) sowie dem Androgenrezeptor-Wildtyp (ARwt). **(B)** Das bakteriell exprimierte GST-Fusionsprotein GST-p85-C-SH2 und GST als Negativkontrolle wurde an Glutathion-Sepharose gekoppelt und mit 10 µl der *in vitro* translatierten, radioaktiv markierten Androgenrezeptor-Deletionsmutanten inkubiert. Nach der *in vitro* Translation der Androgenrezeptor-Konstrukte wurden diese zum einen mit DHT ( $10^{-7}$  M), zum anderen mit dem Lösungsmittel für 10 min behandelt. Die gebundenen Androgenrezeptor-Deletionsmutanten wurden anschließend in einem 10 %igen Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) aufgetrennt und autoradiographisch detektiert. Für den Input wurde 1 µl der *in vitro* Transkription/Translation der Androgenrezeptor-Konstrukte eingesetzt.

Wie erwartet, zeigte der Androgenrezeptor-Wildtyp eine deutliche Interaktion mit der p85-C-SH2-Domäne. Aufgrund der unterschiedlich deletierten Regionen

des Androgenrezeptors konnte die Bindungsstelle der C-SH2-Domäne der p85-Untereinheit sowohl im N-Terminus des Androgenrezeptors (siehe Ergebnis mit dem AR $\Delta$ HBD-Konstrukt) als auch mit der Hormonbindedomäne des Androgenrezeptors (siehe Ergebnis mit dem AR $\Delta$ TAD-Konstrukt) lokalisiert werden. Dieses Resultat deutet darauf hin, dass sich mindestens zwei unabhängige p85-C-SH2-Bindungsmotive auf dem Androgenrezeptor befinden. Ein Vergleich der Banden mit dem jeweiligen Input der Androgenrezeptor-Konstrukte zeigt eine annähernd gleich starke Bindung sowohl zum N-Terminus als auch zum C-Terminus des Androgenrezeptors.

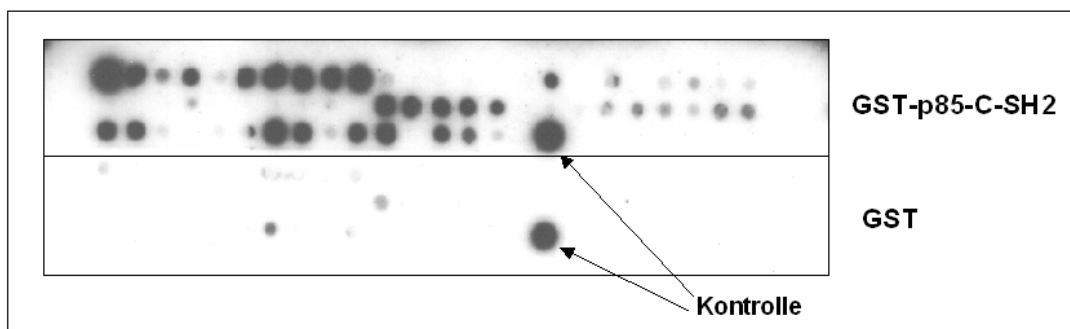
### **4.3 Charakterisierung der Bindungsstellen im N-und C-Terminus des Androgenrezeptors**

Um die Bindung zwischen der C-SH2-Domäne der regulatorischen Untereinheit p85 der PI3-Kinase und dem Androgenrezeptor näher zu charakterisieren, sollte die Bindungsoberfläche weiter eingegrenzt und die an der Bindung beteiligten Aminosäuren identifiziert werden.

#### **4.3.1 Identifizierung der Bindungsaminosäuren mittels Peptidarray und nachfolgender Alanin-Substitution**

Zur genauen Lokalisierung des Interaktionsbereiches im N- und C-Terminus des Androgenrezeptors wurden Peptidarrays genutzt. Das Prinzip der SPOT-Technologie, mit der die Peptidarrays erstellt werden, basiert auf der gezielten Synthese von Peptiden auf definierten Positionen (SPOTs) einer Zellulosemembran (Frank *et al.*, 1988; Eichler *et al.*, 1991). Durch die definierte Position jedes Peptidspots bietet der Peptidarray die Möglichkeit, von einem detektierten Signal direkt zu einer Sequenzinformation, bzw. der Aminosäuresequenz, zu gelangen. Sämtliche Peptidarrays wurden vollautomatisch unter der Leitung von Frau Dr. Ester in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Uetz im Forschungszentrum Karlsruhe am Institut für Toxikologie und Genetik synthetisiert. Dazu wurden die Sequenzen des N-Terminus von Aminosäure 1 bis 567 und die des C-Terminus von Aminosäure 600 bis 919 des humanen Androgenrezeptors als Peptide N-terminal kovalent an einer aktivierten Zellulosemembran als Trägermatrix

immobilisiert. Die gespotteten Aminosäuresequenzen des N- und C-Terminus des Androgenrezeptors sind im Anhang in Abbildung A.1 und A.2 aufgeführt. Als Positivkontrolle diente ein Epitop der Glutathion-S-Transferase (GST) (Kontrollpeptid: QRALAKDLIVPRRP), was ebenfalls als Spot aufgetragen wurde. Der Sequenzbereich der Peptide, bestehend aus 15 Aminosäuren, wurde dabei von einem Spot zum nächsten Spot um jeweils drei Aminosäuren zum C-Terminus verschoben, so dass durch die Sequenzüberlappungen zum einen eine gewisse Redundanz sichergestellt wurde und zum anderen durch die Positionsverschiebung der Aminosäuren sterische Parameter, wie z.B. Zugänglichkeit der Aminosäuren, so wenig wie möglich inhibierend wirken. Dies wurde solange fortgesetzt, bis die gesamte Sequenz auf diese Weise auf eine Membran gespottet war. Die sich anschließende Hybridisierung mit dem Interaktionspartner erlaubt die Identifikation jener bindenden Bereiche der Aminosäuresequenz, welche die Interaktion zwischen Androgenrezeptor und der p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase vermitteln. Für die Hybridisierung der Membranen wurde das Fusionsprotein GST-p85-C-SH2 verwendet. Peptide, die eine Bindung aufwiesen, konnten immunologisch mit einem gegen GST gerichteten Antikörper detektiert werden. Um unspezifische Bindungen durch GST ausschließen zu können, wurden jeweils zwei Membranen mit der identischen Aminosäuresequenz synthetisiert. Während die erste Membran mit GST-p85-C-SH2 inkubiert wurde, erfolgte die Hybridisierung der zweiten Membran mit GST als Kontrolle. Als Beispiel für die durchgeführten Peptidarrays wurde in Abbildung 4.9 das Ergebnis mit der gespotteten Androgenrezeptor-Hormonbindedomäne dargestellt.

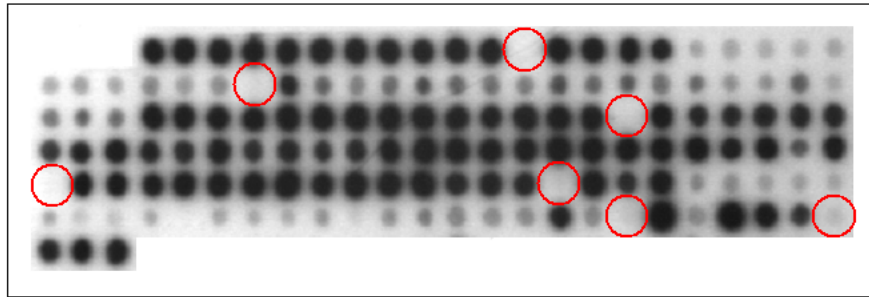


**Abb. 4.9: Peptidarray mit der gespotteten Hormonbindedomäne des Androgenrezeptors.** Mit Hilfe der SPOT-Technologie wurden die Aminosäuren 600 bis 919, welche die Hormonbindedomäne des Androgenrezeptors repräsentieren in Peptiden von jeweils 15 Aminosäuren

auf eine Zellulosemembran gespottet. Die Sequenz jedes Peptides wurde jeweils um drei Aminosäuren verschoben. Die Hybridisierung der Membran erfolgte mit dem Fusionsprotein GST-p85-C-SH2. Als Kontrolle wurde eine zweite identisch gespottete Membran, welche nur mit GST hybridisiert wurde, mitgeführt. Die Detektion der Interaktionen erfolgte mit einem Anti-GST-Antikörper. Zusätzlich wurde ein Epitop der Glutathion-S-Transferase als Antikörper-Kontrolle aufgetragen.

Positive Spots bzw. Peptide, die eine Interaktion zur p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase zeigten, sind als dunklere Spots zu erkennen. Die identisch gespottete Membran, welche nur mit GST allein als Negativkontrolle hybridisiert wurde, weist keine Bindung außer mit dem Kontrollpeptid für GST auf, was eine unspezifische Bindung durch den GST-Anteil ausschließt. Von Interesse sind vor allem Membranbereiche, die mehrere aufeinander folgende positive Spots aufweisen. Durch die aufgrund der 3er-Verschiebung entstandenen Sequenzüberlappungen können potentielle Bindungsstellen, die mehrere positive Spots hintereinander hervorrufen, festgestellt und Fehler, die durch falsch-positive Bindungen entstehen, verringert werden.

Die Peptide, die im Peptidarray eine Interaktion zur p85-C-SH2-Domäne gezeigt haben, wurden nachfolgend für eine Alanin-Substitution herangezogen. Im Alanin-Scan wird jede Aminosäure im Peptid einmal gegen Alanin ausgetauscht, wobei pro Peptid immer nur eine Aminosäure ersetzt wird. Der Austausch der einzelnen Aminosäuren zeigt, welche Aminosäuren genau für die Interaktion verantwortlich sind. Die so veränderten Peptide wurden ebenfalls auf eine Zellulosemembran gespottet und wie die vorangegangenen Peptidarrays auf Interaktion mit der p85-C-SH2-Domäne untersucht. Mit den positiven Spots, aus dem für den N-Terminus durchgeführten Peptidarray, wurde gleichermaßen verfahren. Das in Abbildung 4.10 dargestellte Ergebnis des Alanin-Scans, welcher die positiven Peptide des Peptidarrays mit dem C-terminalen Bereich des Androgenrezeptors repräsentiert, steht als Beispiel für alle durchgeführten Alanin-Substitutionen.



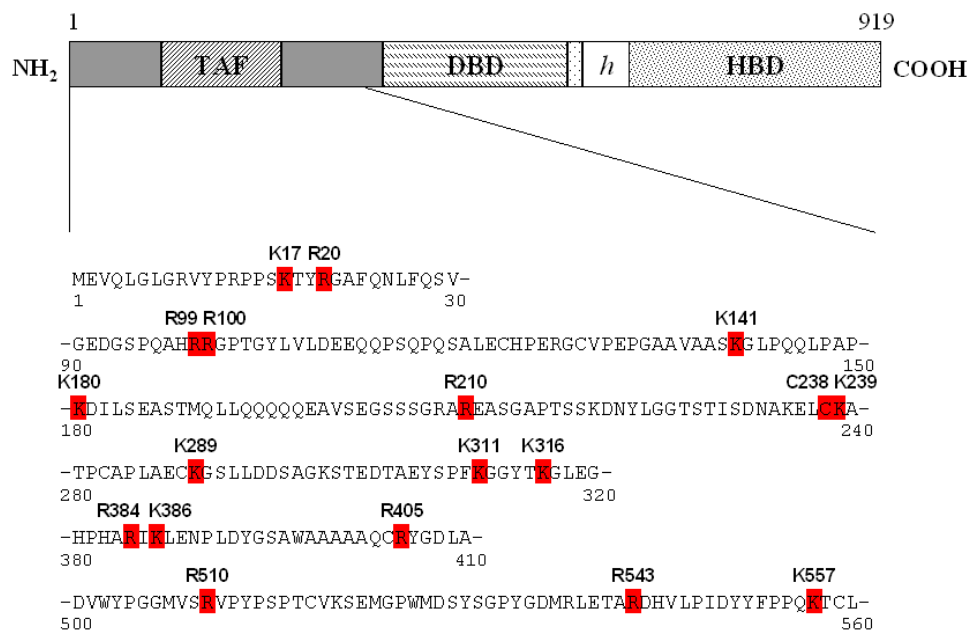
**Abb. 4.10: Alanin-Substitution der positiven Spots aus dem Peptidarray mit dem C-terminalen Bereich des Androgenrezeptors.** Für die Alanin-Substitution wurden die zuvor im Peptidarray als positiv identifizierten Peptide, welche Bindung zur p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase aufwiesen, verwendet. Jede Aminosäure im Peptid wurde einmal gegen Alanin ausgetauscht, wobei pro Peptid immer nur ein Austausch stattfand. Die Hybridisierung der Membran erfolgte wie bei den vorangegangenen Peptidarrays mit dem Fusionsprotein GST-p85-C-SH2. Die Detektion der Interaktionen erfolgte mit einem Anti-GST-Antikörper. Zusätzlich wurde ein Epitop der Glutathion-S-Transferase als Antikörper-Kontrolle aufgetragen. Die rot umkreisten Spots markieren die Peptide, welche eine Aminosäure enthalten, die durch den Austausch zu Alanin keine Bindung mehr mit der p85-C-SH2-Domäne zeigen.

Für die Auswertung der Alanin-Substitutionen sind die Spots wichtig, die keine Interaktion mehr mit der C-SH2-Domäne zeigen. Die in Abbildung 4.10 rot markierten Positionen kennzeichnen die Peptide, welche eine Aminosäure enthalten, bei deren Austausch zu Alanin sich keine Bindung mehr zeigt. Im Fall der Hormonbindedomäne des Androgenrezeptors wurden sechs Aminosäuren identifiziert. Der durchgeführte Peptidarray mit der sich anschließenden Alanin-Substitution ergab für den N-Terminus des Androgenrezeptors 18 identifizierte Aminosäuren. Die Ergebnisse für den N- und den C-terminalen Bereich sind in Tabelle 4.1 und 4.2 mit der jeweiligen Aminosäureposition aufgelistet. Ergänzend wurden die identifizierten Aminosäuren in der entsprechenden Sequenz gekennzeichnet (rot unterlegt) und in Verbindung mit dem Androgenrezeptor dargestellt (s. Abb. 4.11 für den N-Terminus und Abb. 4.12 für den C-Terminus des Androgenrezeptors).

## Ergebnisse

**Tab. 4.1: Übersicht der durch Peptidarray und anschließender Alanin-Substitution identifizierten Aminosäuren im N-terminalen Bereich des Androgenrezeptors.** Angegeben sind die insgesamt 18 ermittelten Aminosäuren mit ihrer jeweiligen Position im N-Terminus des Androgenrezeptors.

Nr.	Aminosäure	Position
1	Lysin (K)	17
2	Arginin (R)	20
3	Arginin (R)	99
4	Arginin (R)	100
5	Lysin (K)	141
6	Lysin (K)	180
7	Arginin (R)	210
8	Cystein (C)	238
9	Lysin (K)	239
10	Lysin (K)	289
11	Lysin (K)	311
12	Lysin (K)	316
13	Arginin (R)	384
14	Lysin (K)	386
15	Arginin (R)	405
16	Arginin (R)	510
17	Arginin (R)	543
18	Lysin (K)	557

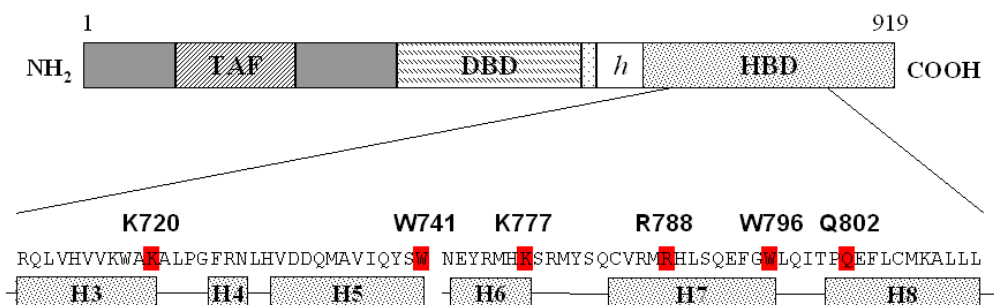


**Abb. 4.11: Schematische Darstellung der Lokalisation der durch Peptidarray und Alanin-Substitution identifizierten Aminosäuren im N-Terminus des Androgenrezeptors.** Die 18 positiv identifizierten Aminosäuren sind rot unterlegt und mit der jeweiligen Aminosäureposition gekennzeichnet. Der schematisch abgebildete Androgenrezeptor stellt den verwendeten

Sequenzbereich dar. Bei den beschrifteten Domänen handelt es sich um die N-terminal gelegene Transaktivierungsfunktionsdomäne TAF, daran anschließend befindet sich die DNA-Bindedomäne DBD, mit *h* ist die *Hinge*-Region des Androgenrezeptors gekennzeichnet und abschließend ist die Hormonbindedomäne HBD lokalisiert.

**Tab. 4.2: Übersicht der durch Peptidarray und anschließender Alanin-Substitution identifizierten Aminosäuren im C-terminalen Bereich des Androgenrezeptors.** Angegeben sind die insgesamt sechs ermittelten Aminosäuren mit ihrer jeweiligen Position im C-Terminus des Androgenrezeptors.

Nr.	Aminosäure	Position
1	Lysin (K)	720
2	Tryptophan (W)	741
3	Lysin (K)	777
4	Arginin (R)	788
5	Tryptophan (W)	796
6	Glutamin (Q)	802



**Abb. 4.12: Schematische Darstellung der Lokalisation der durch Peptidarray und Alanin-Substitution identifizierten Aminosäuren im C-Terminus (Hormonbindedomäne) des Androgenrezeptors.** Die sechs positiv identifizierten Aminosäuren sind rot unterlegt und mit der jeweiligen Aminosäureposition gekennzeichnet. Die in grau dargestellten Boxen stellen die Helices der Hormonbindedomäne dar, die durch Röntgenstrukturanalysen identifiziert wurden. Der schematisch abgebildete Androgenrezeptor stellt den verwendeten Sequenzbereich dar. Bei den beschrifteten Domänen handelt es sich um die N-terminal gelegene Transaktivierungsfunktionsdomäne TAF, daran anschließend befindet sich die DNA-Bindedomäne DBD, mit *h* ist die *Hinge*-Region des Androgenrezeptors gekennzeichnet und abschließend ist die Hormonbindedomäne HBD lokalisiert.

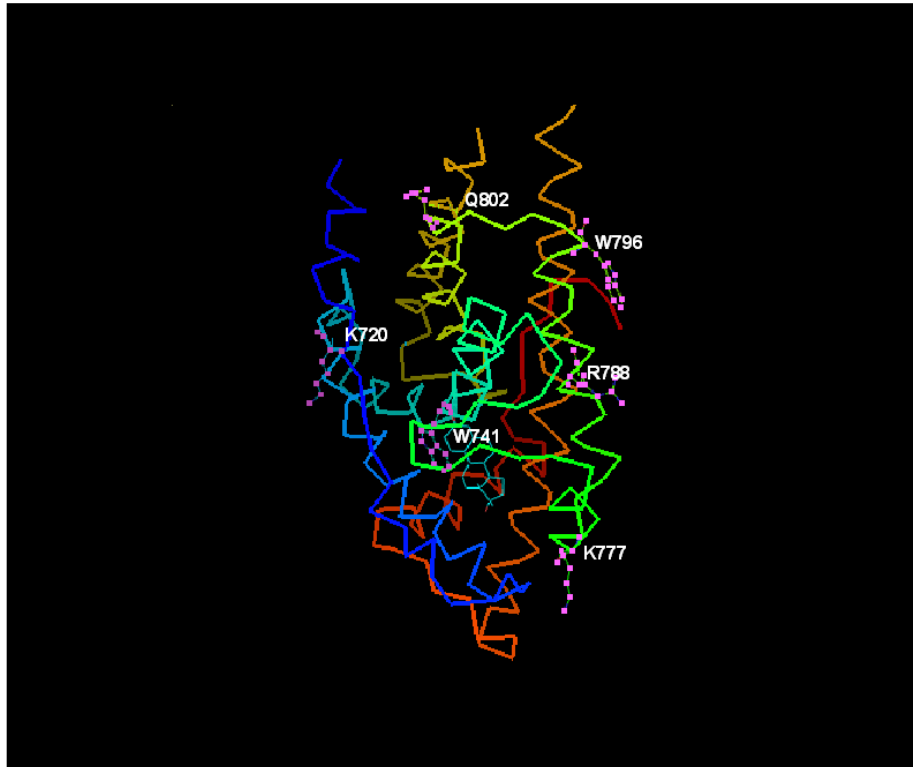
Für die Bindung mit der p85-C-SH2-Domäne wurden im N-terminalen Bereich des Androgenrezeptors 18 Aminosäuren und für die Hormonbindedomäne sechs Aminosäuren identifiziert. Aufgrund der umfangreichen Anzahl von 18 Aminosäuren für den N-Terminus, konzentrierte sich die weitere Arbeit auf die ermittelten Aminosäuren in der Hormonbindedomäne des Androgenrezeptors. Die Hormonbindedomäne des Androgenrezeptors ist in 12 Helices gegliedert, die durch Röntgenstrukturanalysen identifiziert wurden und welche die Ligandenbindung, aber auch die Bindung verschiedener Coaktivatoren ermöglicht (Tsai und O'Malley, 1994; Quigley *et al.*, 1995). Die interagierenden Aminosäuren verteilen sich auf die Helices 3, 5, 6, 7 und 8 der Hormonbindedomäne. Ein Vergleich mit der Bindungssequenz der Coaktivatoren (Hur *et al.*, 2004) ergab lediglich die Übereinstimmung der Aminosäure Lysin an Position 720, welche in allen Nuklearrezeptoren hoch konserviert und Teil der Coaktivator-Bindungsoberfläche ist (siehe Anhang Abb. A.3 und A.4). Da die sechs identifizierten Aminosäuren zum Großteil nicht Bestandteil dieses bekannten Bindungsmotivs sind, könnten sie Teil einer neuen Protein-Protein-Bindungsoberfläche sein.

Um einen weiteren Anhaltspunkt für ein mögliches Bindungsmotiv zu erhalten, wurden die identifizierten Aminosäuren in der dreidimensionalen Struktur der Hormonbindedomäne in ihrer räumlichen Anordnung dargestellt.

### **4.3.2 Dreidimensionale Darstellung der Hormonbindedomäne des Androgenrezeptors mit den identifizierten Aminosäuren**

Die Darstellung der Kristallstruktur des kompletten Androgenrezeptors ist nicht möglich. Lediglich die Hormonbindedomäne konnte in den vergangenen Jahren kristallographisch ermittelt werden (Matias *et al.*, 2000; Sack *et al.*, 2001). Durch unsere Kollaborationspartner Prof. Dr. Moras und Dr. Ruff am *Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC) Illkirch der Louis Pasteur University in Strasbourg* konnten die sechs ermittelten Aminosäuren in die dreidimensionale Struktur der Hormonbindedomäne des Androgenrezeptors räumlich eingeordnet werden (s. Abb. 4.13).





**Abb. 4.13: Schematische Darstellung der dreidimensionalen Struktur der Hormonbindedomäne des Androgenrezeptors.** Zusätzlich ist die räumliche Anordnung der sechs durch Peptidarray und Alanin-Substitution identifizierten Aminosäuren (Lysin 720, Tryptophan 741, Lysin 777, Arginin 788, Tryptophan 796 und Glutamin 802) gekennzeichnet. Die dreidimensionale Darstellung der Hormonbindedomäne des Androgenrezeptors erfolgte durch Prof. Dr. Moras und Dr. Ruff vom *Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC) Illkirch* der *Louis Pasteur University in Strasbourg*.

Anhand der computerunterstützten Anordnung der Aminosäuren ist zu erkennen, dass sich alle Aminosäuren an der Proteinoberfläche befinden, was eine Interaktion mit der p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase begünstigt. Weiterhin ist eine deutliche räumliche Abgrenzung der Aminosäuren in zwei Cluster feststellbar. So bilden die Aminosäuren K720, W741 und K777 ein solches Cluster und die Aminosäuren R788, W796, Q802 ein weiteres.

#### **4.3.3 Gezielte Punktmutagenese der identifizierten Aminosäuren in der Hormonbindedomäne des Androgenrezeptors**

Um die funktionelle Bedeutung dieser Aminosäuren beurteilen zu können, wurden nachfolgend Punktmutanten hergestellt. Aufbauend auf der räumlichen

Anordnung der Aminosäuren wurden neben Einzelmutanten auch Doppel- und Mehrfachmutanten erstellt. Da es sich vermutlich um eine Bindungsoberfläche handelt, die von mehreren Aminosäuren realisiert wird, wurden verschiedene Kombinationen der einzelnen Aminosäuren angefertigt. Mit Hilfe der gerichteten Punktmutagenese wurden die Aminosäuren der potentiellen Bindungsstelle gegen Alanin ausgetauscht. Lediglich bei der Aminosäure K720 erfolgte der Austausch gegen Histidin. Eine Substitution von Lys-720 gegen alle Aminosäuren führte beim Austausch gegen Histidin zur geringsten Bindungsintensität. Bei allen weiteren fünf Aminosäuren wurden ausschließlich Alanin-Substitutionen durchgeführt. Zur Herstellung der DNA-Konstrukte wurde der *QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) verwendet. Als Template diente der pSG5 Vektor mit der humanen cDNA des Androgenrezeptor-Wildtyps. Die eingeführten Mutationen wurden durch Sequenzierung bestätigt. Die so entstandenen Konstrukte sind in Tabelle 4.3 aufgelistet.

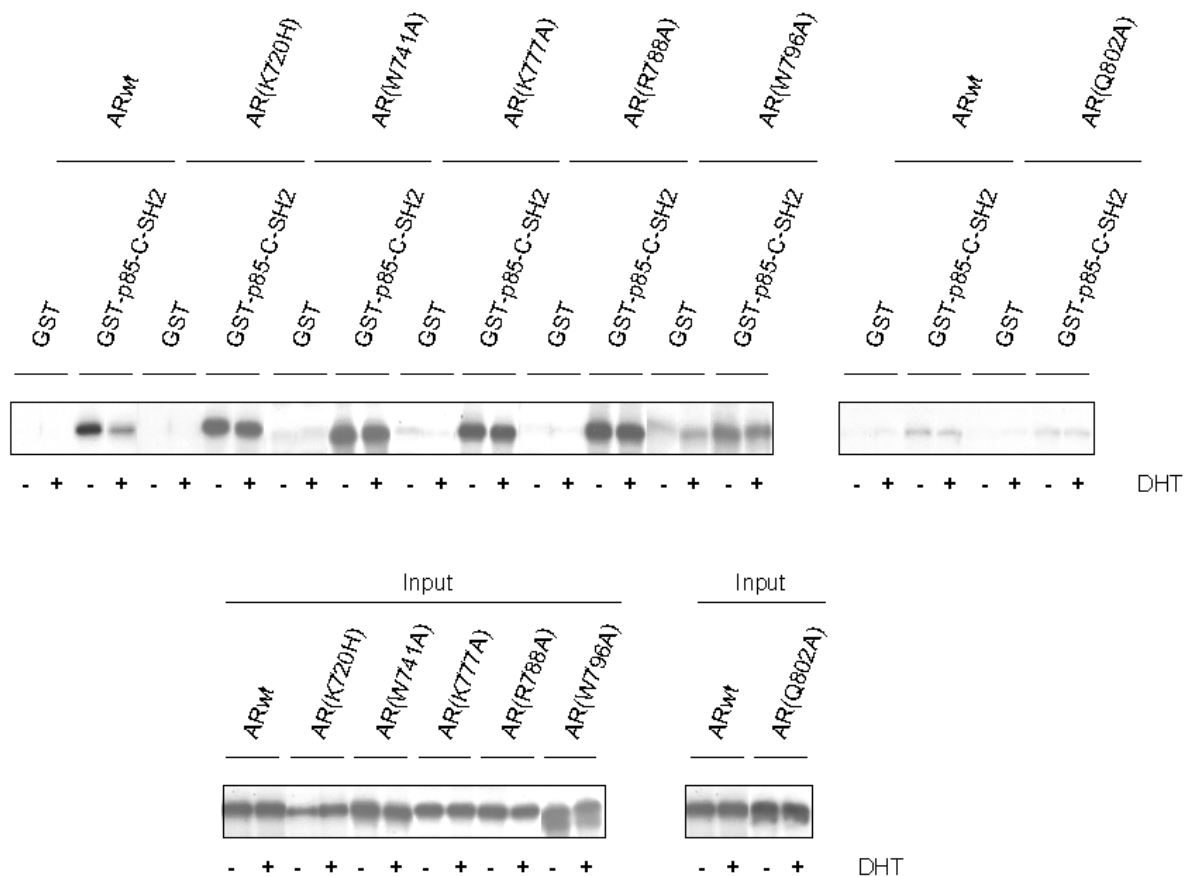
**Tab. 4.3: Übersicht der Einzel-, Doppel- und Mehrfachmutanten des Androgenrezeptors.**

Die Punktmutationen wurden mit Hilfe des *QuikChange® II Site-Directed-Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) hergestellt. Die erfolgreiche Mutagenese wurde durch Sequenzierung bei der Firma GATC (Konstanz) überprüft.

<b>Einzelmutanten</b>	K720H
	W741A
	R777A
	R788A
	W796A
	Q802A
<b>Doppelmutanten</b>	K720H/W741A
	R777A/R788A
	W796A/Q802A
<b>Mehrfachmutanten</b>	K720H/W741A/R777A
	K720H/W741A/R777A/R788A

#### 4.3.4 Überprüfung der Punktmutanten auf Bindung zur p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase

Anschließend wurde die Funktionalität der Androgenrezeptor-Mutanten in mehreren GST-Interaktionsstudien auf Bindung zur p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase überprüft. In Abbildung 4.14 ist das Ergebnis mit den *in vitro* translatierten L-[<sup>35</sup>S]-markierten Androgenrezeptor-Einzelmutanten und dem GST-p85-C-SH2-Konstrukt dargestellt.



**Abb. 4.14: GST-Interaktionsstudien mit GST-p85-C-SH2 und den Androgenrezeptor-Einzelmutanten aus der Hormonbindedomäne.** Das bakteriell exprimierte GST-Fusionsprotein GST-p85-C-SH2 und GST allein als Negativkontrolle wurden an Glutathion-S-Sepharose gekoppelt und mit 10 µl *in vitro* translatiertem, L-[<sup>35</sup>S]-radioaktiv markiertem Androgenrezeptor-Wildtyp und Androgenrezeptor-Einzelmutanten der Hormonbindedomäne inkubiert. Nach der *in vitro* Translation der Androgenrezeptor-Konstrukte AR<sub>wt</sub>, AR(K720H), AR(W741A), AR(K777A), AR(R788A), AR(W796A) und AR(Q802A) wurden diese für 10 min zum einen mit DHT, zum anderen mit dem Lösungsmittel behandelt. Die gebundenen

Androgenrezeptor-Konstrukte wurden in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch detektiert. Für den Input wurde jeweils 1 µl der *in vitro* Transkription/Translation der Androgenrezeptor-Konstrukte eingesetzt. Die Punktmutante AR(Q802A) wurde in einem zweiten *pull down*-Experiment auf Interaktion mit GST-p85-C-SH2 getestet und deshalb separat dargestellt.

Die Substitution der Aminosäuren hatte keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten des Androgenrezeptors zur p85-C-SH2-Domäne. Alle Androgenrezeptor-Einzelmutanten zeigten nach wie vor Interaktion zur C-SH2-Domäne der PI3-Kinase. Die Bindung der Punktmutante AR(Q802A) wurde in einem zweiten *pull down*-Experiment getestet und ist deshalb getrennt aufgeführt. Die schwächere Bindung mit dieser Mutante gegenüber den anderen Einzelmutanten ist mit der in diesem Experiment insgesamt schwachen Detektion der Interaktionsbanden zu erklären. Um Interpretationsfehler zu vermeiden, wurde der Androgenrezeptor-Wildtyp in diesem Experiment mit ebenfalls schwacher Bindung gezeigt. Die auf Interaktion getesteten Doppel- und Mehrfachmutanten des Androgenrezeptors zeigten ebenso Bindung zur p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase (s. Abb. A.5 im Anhang). Die Ergebnisse der Interaktionsstudien verdeutlichen, dass die Mutationen der in der Hormonbindedomäne identifizierten Aminosäuren nicht ausreichen, um die Interaktion zur PI3-Kinase zu beeinträchtigen.

### **4.3.5 Abgleich der identifizierten Aminosäuren mit bereits bekannten Mutationen klinischen Phänotyps**

Ein Vergleich mit der Datenbank für Androgenrezeptormutationen ([www.mcgill.ca/androgendb/](http://www.mcgill.ca/androgendb/)) ergab, dass für die Aminosäuren der Positionen 720, 741, 788, 796 und 802 bereits Mutationen mit klinischen Phänotyp beschrieben wurden (siehe Tab. 4.4). Mutationen, die Prostatakrebs und unterschiedliche Formen von AIS (Androgeninsensitivitätssyndrom) hervorrufen, bestätigen die Relevanz der Aminosäuren. Die Ursache für die Androgenresistenz entsteht in erster Linie durch Mutationen im Androgenrezeptor. Die Krankheit ist charakterisiert durch ein vollständiges oder partielles Ausbleiben der Androgenwirkung. Das klinische Erscheinungsbild der Betroffenen kann hierbei das ganze Spektrum von einem typisch weiblichen Phänotyp (komplette

Androgenresistenz, *Complete Androgen Insensitivity Syndrome*, CAIS) über unterschiedlich ausgeprägte intersexuelle Formen bis zu einem mehr oder minder normalen männlichen Phänotyp umfassen (partielle Androgenresistenz, *Partial Androgen Insensitivity Syndrome*, PAIS) oder (minimale Androgenresistenz, *Minimum Androgen Insensitivity Syndrome*, MAIS) (Quigley *et al.*, 1995).

**Tab. 4.4: Auflistung der bereits bekannten Androgenrezeptormutationen mit klinischem Phänotyp.** Für fünf der identifizierten Aminosäuren sind bereits Mutationen des Androgenrezeptors beschrieben. In der Tabelle sind der Aminosäureaustausch mit dem jeweiligen klinischen Krankheitsbild und der Referenz aufgelistet. Die Androgenrezeptor-Mutationen führen zu verschiedenen klinischen Krankheitsbildern: Prostatakrebs, CAIS (*Complete Androgen Insensitivity Syndrome*), PAIS (*Partial Androgen Insensitivity Syndrome*) und MAIS (*Minimum Androgen Insensitivity Syndrome*).

Aminosäure-Position	Austausch	Klinischer Phänotyp	Referenz
720	K → E	Prostatakrebs	Kleinerman <i>et al.</i> , 1996
741	W → C	Prostatakrebs, PAIS	Taplin <i>et al.</i> , 2003; Haapala <i>et al.</i> , 2001; Melo <i>et al.</i> , 2003
	W → Stop	Prostatakrebs	Takahashi <i>et al.</i> , 1995
	W → R	CAIS	Marcelli <i>et al.</i> , 1994
	W → L	CAIS	Avila <i>et al.</i> , 2002
788	R → Verdoppelung	CAIS	Ledig <i>et al.</i> , 2005
	R → S	MAIS, PAIS	Lumbroso <i>et al.</i> , 1999; Deeb <i>et al.</i> , 2005
796	W → Stop	CAIS	Marcelli <i>et al.</i> , 1990
802	Q → R	PAIS	Chavez <i>et al.</i> , 2001

#### 4.3.6 Generierung und Überprüfung der Punktmutanten mit relevantem klinischen Phänotyp

Die Generierung einiger Punktmutanten mit relevantem klinischen Phänotyp sollte zeigen, ob die Substitution gegen eine andere Aminosäure als Alanin einen Effekt auf die Interaktion mit der p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase

besitzt. Im Folgenden wurden die Aminosäuren Tryptophan 741 gegen Cystein und Arginin (Taplin *et al.*, 2003; Haaplaa *et al.*, 2001; Melo *et al.*, 2003; Marcelli *et al.*, 1994), Arginin 788 gegen Serin (Lumbroso *et al.*, 1999; Deeb *et al.*, 2005) und Glutamin 802 gegen Arginin (Chavez *et al.*, 2001) ausgetauscht und auf Interaktion mit der PI3-Kinase untersucht. Die Ergebnisse der GST-Interaktionsstudien zeigten ebenfalls unverändert Bindung zur p85-C-SH2-Domäne (siehe Anhang Abb. A.6).

### **4.4 Charakterisierung der Bindungsstellen auf der p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase**

Ein weiterer Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der genauen Lokalisation der Bindungsstellen auf der C-SH2-Domäne der p85-regulatorischen Untereinheit der PI3-Kinase. Dabei wurde wie mit dem N- und C-Terminus des Androgenrezeptors verfahren.

#### **4.4.1 Identifizierung der Bindungsaminosäuren mittels Peptidarray und nachfolgender Alanin-Substitution**

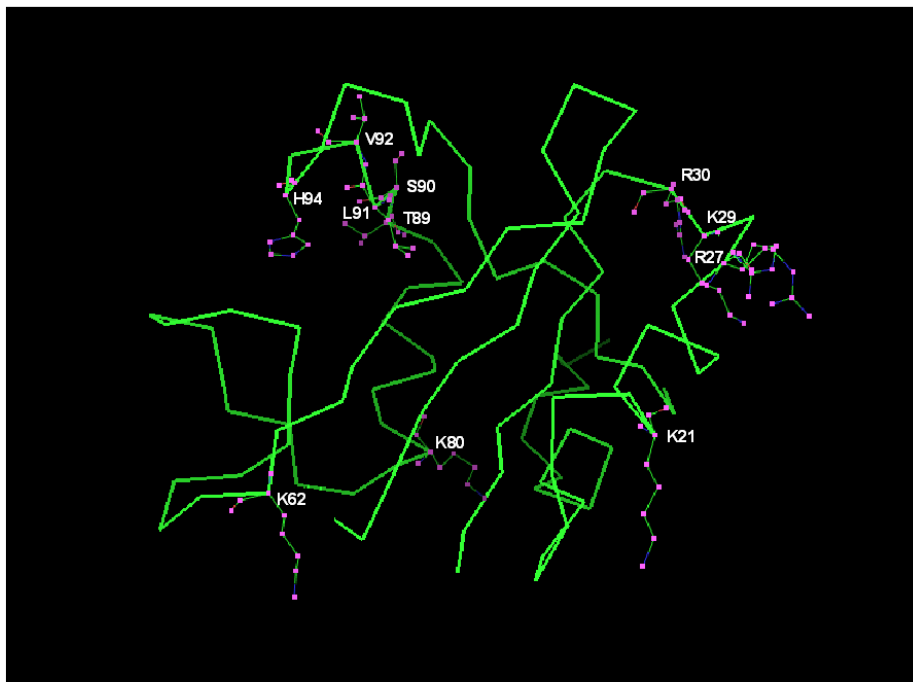
Die Sequenz der p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase (siehe Anhang Abb.A.7) wurde ebenfalls mit der SPOT-Technologie auf eine Zellulosemembran aufgetragen und mit einem GST-fusionierten Androgenrezeptor-Konstrukt hybridisiert. Da eine Aufreinigung des vollständigen Androgenrezeptor-Proteins und des C-terminalen Bereiches des Rezeptors aus technischen Gründen nicht möglich war, wurde für die Hybridisierung GST-AR-AF1 verwendet, welches den N-terminalen Bereich des Androgenrezeptors von Aminosäure 1 bis 537 abdeckt. Die Ergebnisse des Peptidarrays und die sich anschließende Alanin-Substitution sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst.

**Tab. 4.5:** Übersicht der durch Peptidarray und anschließender Alanin-Substitution identifizierten Aminosäuren der C-SH2-Domäne der p85-Untereinheit der PI3-Kinase. Angegeben sind die insgesamt 11 ermittelten Aminosäuren mit ihrer jeweiligen Position in der p85-C-SH2-Domäne.

Nr.	Aminosäure	Position
1	Lysin (K)	21
2	Arginin (R)	27
3	Lysin (K)	29
4	Arginin (R)	30
5	Lysin (K)	62
6	Lysin (K)	80
7	Threonin (T)	89
8	Serin (S)	90
9	Leucin (L)	91
10	Valin (V)	92
11	Histidin (H)	94

#### 4.4.2 Dreidimensionale Darstellung der p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase mit den identifizierten Aminosäuren

In der dreidimensionalen Darstellung der p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase konnten auch hier die im Peptidarray gefundenen Aminosäuren in ihrer räumlichen Anordnung dargestellt werden (s. Abb. 4.15).



**Abb. 4.15:** Schematische Darstellung der dreidimensionalen Struktur der C-SH2-Domäne der p85-Untereinheit der PI3-Kinase. Zusätzlich ist die räumliche Anordnung der 11 durch

Peptidarray und Alanin-Substitution identifizierten Aminosäuren (Lysin 21, Arginin 27, Lysin 29, Arginin 30, Lysin 62, Lysin 80, Threonin 89, Serin 90, Leucin 91, Valin 92 und Histidin 94) gekennzeichnet. Die dreidimensionale Darstellung der p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase erfolgte ebenfalls durch Prof. Dr. Moras und Dr. Ruff vom *Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC) Illkirch der Louis Pasteur University in Strasbourg*.

Wie bereits auf der Hormonbindedomäne des Androgenrezeptors sind auch hier die identifizierten Bindungsaminosäuren auf der Oberfläche der C-SH2-Domäne lokalisiert und bilden in diesem Fall drei deutlich voneinander abgegrenzte Gruppierungen. Das erste Cluster wird von den Aminosäuren T89, S90, L91, V92 und H94 gebildet. Die zwei weiteren Gruppen werden von K62 und K80 sowie K21, R27, K29 und R30 repräsentiert. Aufgrund der oberflächlichen Lokalisation sind sie für eine Bindung leicht zugänglich und kommen als potentielle Bindungsstellen in Frage.

#### **4.4.3 Vergleich der identifizierten Aminosäuren mit dem Phosphotyrosin-Bindungsmotiv der p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase**

Basierend auf den Ergebnissen der vorherigen *in vitro* Interaktionsstudien wird die Interaktion zwischen der PI3-Kinase und dem Androgenrezeptor durch die C-SH2-Domäne der p85-Untereinheit der PI3-Kinase und dem N- und C-Terminus des Androgenrezeptors vermittelt.

Die SH2-Domäne ist eine hoch konservierte Region von etwa 100 Aminosäuren und wurde, da sie zuerst in der zytoplasmatischen Tyrosinkinase c-Src identifiziert wurde, als Src-Homologie-2-Domäne (SH2-Domäne) bezeichnet (Pawson und Schlessinger, 1993). Es ist bekannt, dass SH2-Domänen bevorzugt an Sequenzen binden, die Phosphotyrosin enthalten (Songyang *et al.*, 1993). Die Affinität der Bindung von SH2-Domänen wird dabei durch die den Phosphotyrosinrest flankierende Aminosäuresequenz bestimmt. Jede SH2-Domäne bindet daher nur an einen Phosphotyrosinrest in einem bestimmten Sequenzkontext, was die Interaktionsspezifität definiert. Die p85-SH2-Domänen binden an eine Sequenz, welche Methionin (M) enthält, was drei Aminosäuren C-terminal vom Phosphotyrosin (pY) liegt (pYXXM) (Nolte *et al.*, 1996; Breeze *et al.*, 1996). X steht für eine beliebige Aminosäure. Für die Bindung mit dem Phosphotyrosinrest befindet sich deshalb auf der SH2-Domäne der p85-Unter-



einheit eine spezielle Bindungsregion. Die Sequenz der p85-C-SH2-Domäne und die Bindungsamino­säuren, mit denen die Phosphotyrosin-haltigen Peptide interagieren, sind im Anhang in Abbildung A.8 dargestellt. Da bis zu diesem Zeitpunkt keine Phosphorylierungsstellen für Tyrosin auf dem Androgenrezeptor bekannt waren, wurde im nächsten Schritt überprüft, ob es sich überhaupt um eine Phosphotyrosin-abhängige Bindung handelt.

Ein Vergleich dieser Phosphotyrosin-Bindungsstellen mit den im Peptidarray identifizierten Aminosäuren zeigte lediglich bei zwei Aminosäuren (L91 und H94) eine Übereinstimmung (s. Abb. 4.16).

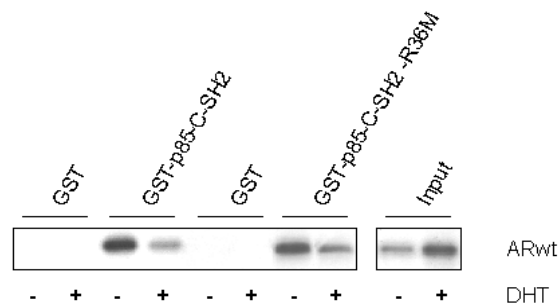
	10		20		30		40	
Seq1:	(GSPI)PHHDEKT	WNV	GSS	NRNKAENLLR	GKRD--G	TFLVRES	SKQ--G	C
Seq2:	(GSPI)PHHDEKT	WNV	GSS	NRNKAENLLR	GKRD--G	TFLVRES	SKQ--G	C
	50		60		70			
Seq1:	YACSVVV	-----DG	EVKHCVI	NKT	AT- GYGF	AEP	YNL	YS
Seq2:	YACSVVV	-----DG	EVKHCVI	NKT	AT- GYGF	AEP	YNL	YS
	80		90		100		110	
Seq1:	SLKELVLHYQHT	SLVQHND	SLNVTLA	YPV	YAQQRR			
Seq2:	SLKELVLHYQHT	SLVQHND	SLNVTLA	YPV	YAQQRR			

**Abb. 4.16: Vergleich der Phosphotyrosin-Bindungsstellen und den im Peptidarray identifizierten Aminosäuren der p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase.** Sowohl Seq1 als auch Seq2 zeigen die Aminosäuresequenz der p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase. Die blau unterlegten Aminosäuren in Seq1 repräsentieren die Bindungsamino­säuren, welche die sogenannte Phosphotyrosintasche auf der SH2-Domäne bilden (Siegal *et al.*, 1998). Die rot gekennzeichneten Aminosäuren, sind die im Peptidarray identifizierten Bindungsstellen zum Androgenrezeptor.

Das Ergebnis zeigt, dass es sich bei der Bindung des Androgenrezeptors und der PI3-Kinase um eine Phosphotyrosin-unabhängige Interaktion handeln muss, da die Phosphotyrosin-Bindungs­oberfläche nicht mit den meisten identifizierten Aminosäuren übereinstimmt.

#### 4.4.4 Auswirkung einer Punktmutation in dem Phosphotyrosin-Bindungsmotiv der p85-C-SH2-Domäne auf die Interaktion mit dem Androgenrezeptor

Für eine weitere Bestätigung der Phosphotyrosin-unabhängigen Interaktion wurde die Bindungsregion dahingehend mutiert, dass eine Interaktion mittels Phosphotyrosinrest nicht mehr möglich ist. Eine Mutation von Arginin an Position 36 zu Methionin zerstört das Bindungsmotiv komplett (Siegal *et al.*, 1998), was mit Hilfe einer gerichteten Punktmutagenese erreicht wurde (siehe Abb. A.8 im Anhang). Zur Herstellung der DNA-Konstrukte wurde der *Quik-Change® II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) verwendet. Als Template diente der pGEX-4T-1-p85-C-SH2 Vektor mit der humanen cDNA der p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase. Die eingeführte Mutation wurde durch Sequenzierung bestätigt. Anschließend wurde die mutierte p85-C-SH2-Domäne bakteriell exprimiert und in einem GST-Interaktionsassay auf Bindung zum Androgenrezeptor getestet (s. Abb. 4.17). Als Positivkontrolle wurde die intakte p85-C-SH2-Domäne benutzt.



**Abb. 4.17: GST-Interaktionsstudie mit dem Androgenrezeptor-Wildtyp und der mutierten p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase.** Die bakteriell exprimierten GST-Fusionsproteine GST-p85-C-SH2, GST-p85-C-SH2-R36M (SH2-Domäne mit mutierter Phosphotyrosin-Bindungsstelle) und GST allein als Negativkontrolle wurden an Glutathion-Sepharose gekoppelt und mit 10 µl *in vitro* translatierten, radioaktiv L-[<sup>35</sup>S]-markierten Androgenrezeptor-Wildtyp inkubiert. Nach der *in vitro* Translation des Androgenrezeptors wurde dieser zum einen mit DHT (10<sup>-7</sup> M), zum anderen mit dem Lösungsmittel für 10 min behandelt. Der gebundene ARwt wurde anschließend in einem 10 %igen Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) aufgetrennt und autoradiographisch detektiert. Für den Input wurde 1 µl der *in vitro* Transkription/Translation des ARwt eingesetzt.

Durch die Substitution der Aminosäure Arginin an Position 36 zu Methionin und der damit verbundenen, zerstörten Phosphotyrosin-Interaktionsstelle konnte gezeigt werden, dass die Verhinderung der Phosphotyrosin-Bindung keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten des Androgenrezeptors an die C-SH2-Domäne der p85-Untereinheit hat. Die Tatsache, dass immer noch Interaktion vorhanden ist, zeigt, dass die Bindung der p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase an den Androgenrezeptor über ein nicht-Phosphotyrosin-haltiges Motiv des Androgenrezeptors realisiert wird.

Aufgrund der Anzahl von 11 identifizierten Aminosäuren ist eine Vorgehensweise wie bei der Hormonbindedomäne des Androgenrezeptors mit der Generierung von Punktmutanten in der C-SH2-Domäne nicht sinnvoll. Um in diesem Fall gezielte Punktmutationen durchzuführen, bedarf es weiterer Anhaltspunkte, welche Aminosäuren für die Bindung von Bedeutung sind. Demzufolge konzentrierte sich die weitere Arbeit auf die Bindungsstellen, die auf dem Androgenrezeptor lokalisiert wurden.

### 4.5 Phosphotyrosin-unabhängiges Bindungsmotiv

Die Ergebnisse der Bindungsstudien mit allen bisher erstellten Punktmutanten, die unverändert Bindung zur p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase aufweisen, bestätigen die Vermutung, dass die Blockierung nur der C-terminalen Interaktion nicht ausreichend ist, um die Bindung komplett zu unterdrücken. Vorangegangene *pull down*-Experimente zeigten sowohl Bindung im N- als auch im C-Terminus des Androgenrezeptors (s. Abb. 4.8). Untersuchungen nach gemeinsamen Übereinstimmungen zwischen den identifizierten Aminosäuren des N- und C-terminalen Bereiches des Androgenrezeptors ergaben, dass mehrere, der ermittelten Aminosäuren, Teil eines sogenannten „basic-X-basic“-Motives sind. Die Arbeitsgruppe um Anderson postuliert eine Phosphotyrosin-unabhängige Bindung der p85-C-SH2-Domäne über ein „basic-X-basic“-Motiv, wobei basic für basische Aminosäuren (Lysin, Arginin und Histidin) und X für eine beliebige Aminosäure steht (King *et al.*, 2000; Fang *et al.*, 2002; Ignatiuk *et al.*, 2006). Im N-Terminus sind sechs der identifizierten Aminosäuren (R99, R100, R210, R384, K386 und R543) und im C-Terminus zwei Aminosäuren (K777 und R788) Bestandteil eines solchen Bindungsmotivs (s. Tab. 4.6).

**Tab. 4.6: Auflistung der „basic-X-basic“-Motive, die mindestens eine identifizierte Aminosäure enthalten. (A)** Im N-Terminus des Androgenrezeptors sind sechs der identifizierten Aminosäuren (R99, R100, R210, R384, K386 und R543) Bestandteil eines „basic-X-basic“-Motivs. Die rot dargestellten Aminosäuren repräsentieren das „basic-X-basic“-Motiv und die jeweils unterstrichenen Aminosäuren kennzeichnen die im Peptidarray ermittelten Aminosäuren, die in der zweiten Spalte nochmals aufgeführt sind. **(B)** Im C-Terminus des Androgenrezeptors sind zwei der identifizierten Aminosäuren (K777 und R788) Bestandteil eines „basic-X-basic“-Motivs. Die rot dargestellten Aminosäuren repräsentieren das „basic-X-basic“-Motiv und die jeweils unterstrichenen Aminosäuren kennzeichnen die im Peptidarray ermittelten Aminosäuren, die in der zweiten Spalte nochmals aufgeführt sind.

**A**

"basic-X-basic"-Motiv	identifizierte Aminosäure
QA <u>HRR</u> GP	R99, R100
SG <u>RARE</u> EA	R210
HP <u>HARIK</u>	R384
HA <u>RIK</u> LE	R384, K386
TA <u>R</u> DHVL	R543

**B**

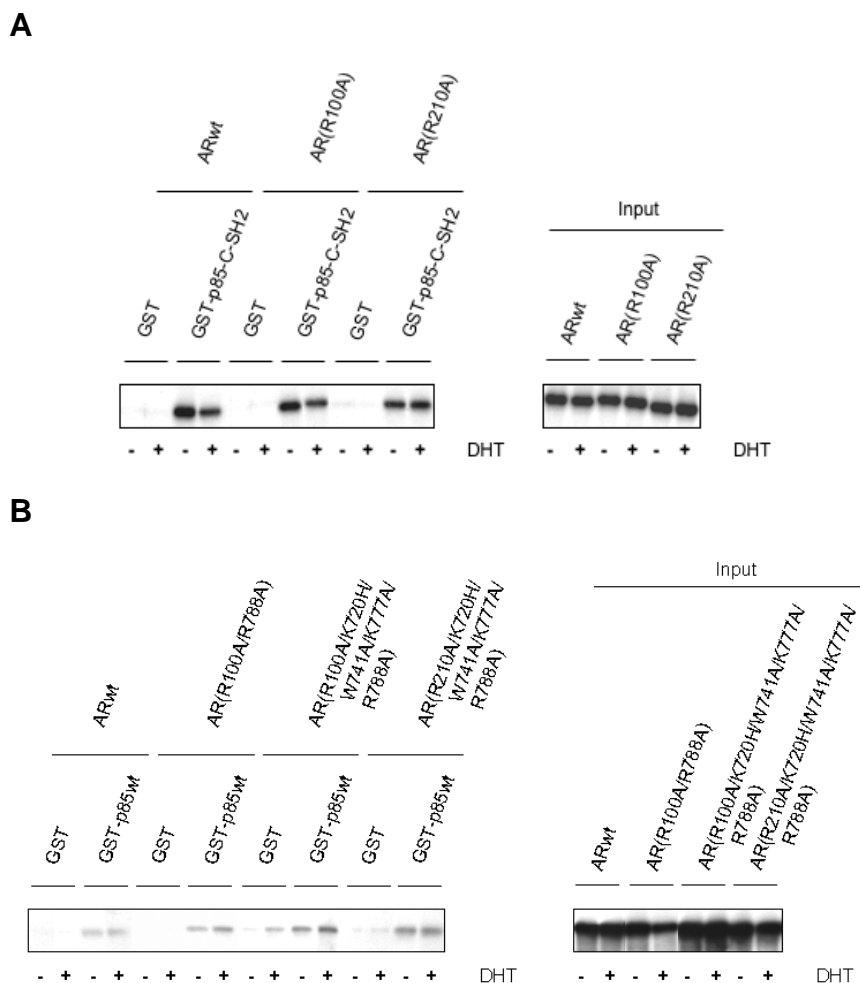
"basic-X-basic"-Motiv	identifizierte Aminosäure
MH <u>KSR</u> MY	K777
CV <u>RMR</u> HL	R788

In den zwei „basic-X-basic“-Motiven QAHRRGP und HARIKLE wurden durch die Peptidarrays zwei Aminosäuren identifiziert. Das „basic-X-basic“-Bindungsmotiv stellt in mehrfacher Hinsicht eine mögliche Erklärung für die N- und C-terminale Bindung der PI3-Kinase an den Androgenrezeptor dar, da es sowohl die Gemeinsamkeit zwischen N- und C-Terminus als auch die Phosphotyrosin-unabhängige C-SH2-Bindung und die Ergebnisse der durchgeführten Peptidarrays berücksichtigt, welche Bestandteile dieser Motive sind (s. Tab. 4.6).

Aus diesem Grund wurden in einigen Fällen Kombinationsmutanten des Androgenrezeptors, welche N-terminale als auch C-terminale „basic-X-basic“-Motive miteinander verbinden, erstellt.

#### 4.5.1 Bindungsstudien mutierter „basic-X-basic“-Motive im N- und C-Terminus des Androgenrezeptors

Die bereits im Labor vorhandenen Androgenrezeptor-Punktmutanten des N-Terminus AR(R100A) und AR(R210A) wurden mit den Punktmutanten AR(K777A), AR(R788A) und AR(K720H, W741A, K777A, R788A) kombiniert. Die Mehrfachmutante wurde, da sie beide mutierten „basic-X-basic“-Motive des C-Terminus und zusätzlich weitere zwei Mutationen enthält und damit eine große Bindungsoberfläche abdeckt, verwendet. Die Einzelpunktmutanten des N-Terminus AR(R100A) und AR(R210A) als auch die erstellten Kombinationsmutanten AR(R100A, R788A), AR(R100A, K720H, W741A, K777A, R788A) und AR(R210A, K720H, W741A, K777A, R788A) wurden in GST-Interaktionsstudien auf ihre Bindung zur p85-Untereinheit überprüft (s. Abb. 4.18).



**Abb. 4.18: GST-Interaktionsstudien mit den Androgenrezeptor-N-Terminusmutanten und den Androgenrezeptor-Kombinationsmutanten. (A)** Das bakteriell exprimierte GST-Fusions-

protein GST-p85-C-SH2 und GST allein als Negativkontrolle wurden an Glutathion-S-Sepharose gekoppelt und mit 10 µl *in vitro* translatiertem, L-[<sup>35</sup>S]-radioaktiv markiertem Androgenrezeptor-Wildtyp und Androgenrezeptor-N-Terminusmutanten inkubiert. Nach der *in vitro* Translation der Androgenrezeptor-Konstrukte ARwt, AR(R100A) und AR(R210A) wurden diese für 10 min zum einen mit DHT, zum anderen mit dem Lösungsmittel behandelt. Die gebundenen Androgenrezeptor-Konstrukte wurden in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch detektiert. Für den Input wurde jeweils 1 µl der *in vitro* Transkription/Translation der Androgenrezeptor-Konstrukte eingesetzt. **(B)** Das bakteriell exprimierte GST-Fusionsprotein GST-p85wt und GST allein als Negativkontrolle wurden an Glutathion-S-Sepharose gekoppelt und mit 10 µl *in vitro* translatiertem, L-[<sup>35</sup>S]-radioaktiv markiertem Androgenrezeptor-Wildtyp und Androgenrezeptor-Kombinationsmutanten inkubiert. Nach der *in vitro* Translation der Androgenrezeptor-Konstrukte ARwt, AR(R100A, R788A), AR(R100A, K720H, W741A, K777A, R788A) und AR(R210A, K720H, W741A, K777A, R788A) wurden diese für 10 min zum einen mit DHT, zum anderen mit dem Lösungsmittel behandelt. Die gebundenen Androgenrezeptor-Konstrukte wurden in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch detektiert. Für den Input wurde jeweils 1 µl der *in vitro* Transkription/Translation der Androgenrezeptor-Konstrukte eingesetzt.

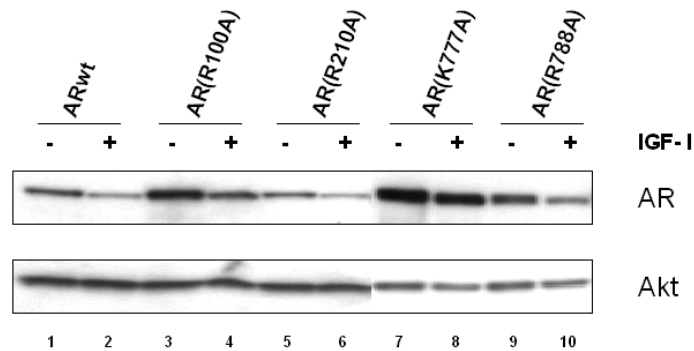
Sowohl die Androgenrezeptor-N-Terminusmutanten AR(R100A) und AR(210A) als auch die verwendeten Kombinationsmutanten zeigten nach wie vor Bindung zur PI3-Kinase. Im Fall der Androgenrezeptor-N-Terminusmutanten wurde die Bindung zur p85-C-SH2-Domäne untersucht und die Kombinationsmutanten wurden auf Interaktion zur vollständigen p85-Untereinheit (p85wt) getestet. Die auch mit diesen Mutanten beobachtete Bindung kann möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass nicht alle vorhandenen „basic-X-basic“-Motive gleichzeitig unterdrückt wurden. Da die Bindungsstudien mit den „basic-X-basic“-Motiv-enthaltenden Kombinationsmutanten des Androgenrezeptors keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten zwischen Androgenrezeptor und PI3-Kinase besitzen, wurden diese Mutanten auf einen möglichen Einfluss auf den IGF-I-induzierten negativ-regulierten Androgenrezeptor-Degradationseffekt überprüft.

#### **4.5.2 Einfluss von IGF-I auf die „basic-X-basic“-Punktmutanten in Bezug auf die Degradation des Androgenrezeptors**

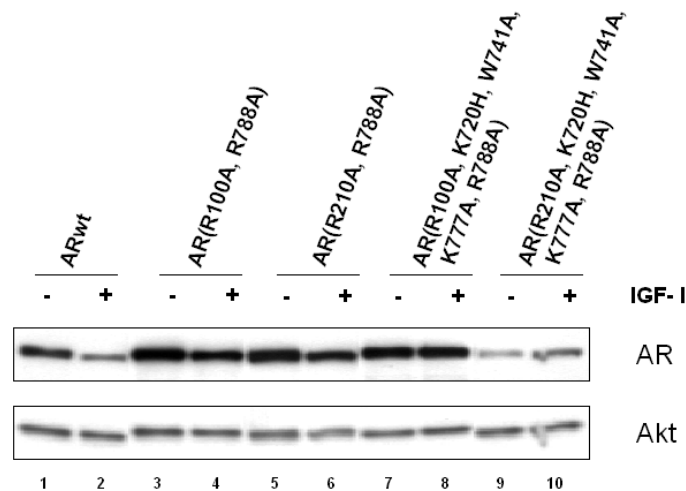
Da für diesen Zweck die Androgenrezeptor-Konstrukte transient transfiziert werden mussten, wurde die Prostatakrebszelllinie DU145 verwendet, welche keine endogene Expression des Androgenrezeptors aufweist. Wie in vorange-

gangenen *Western-blot*-Analysen wurden die zuvor transfizierten Zellen für 24 h mit IGF-I (20 ng/ml) behandelt und anschließend auf die IGF-I-vermittelte Reduktion des Androgenrezeptor-Proteins mit einem Androgenrezeptor-Antikörper untersucht.

**A**



**B**



**Abb. 4.19: Einfluss der „basic-X-basic“-Punktmutanten des N- und C-Terminus des Androgenrezeptors sowie der Kombinationsmutanten auf die IGF-I-induzierte Degradation des Androgenrezeptor-Proteins. (A)** DU145 Zellen wurden 24 h nach der transienten Transfektion mit dem Androgenrezeptor-Wildtyp und den Androgenrezeptor-Konstrukten AR(R100A), AR(R210A), AR(R777A) und AR(R788A) für weitere 24 h mit IGF-I (20 ng/ml) oder nur mit dem Lösungsmittel behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und lysiert. Das Gesamtzelllysate wurde mittels *Western-blot*-Analyse und einem spezifischen Androgenrezeptor-Antikörper und einem Akt-Antikörper als Kontrolle analysiert. **(B)** DU145 Zellen wurden 24 h nach der transienten Transfektion mit dem Androgenrezeptor-Wildtyp und den Androgenrezeptor-Konstrukten AR(R100A, R788A), AR(R210A, R788A), AR(R100A,

K720H, W741A, R777A, R788A) und AR(R210A, K720H, W741A, R777A, R788A) für weitere 24 h mit IGF-I (20 ng/ml) oder nur mit dem Lösungsmittel behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und lysiert. Das Gesamtzelllysat wurde mittels *Western-blot*-Analyse und einem spezifischen Androgenrezeptor-Antikörper und einem Akt-Antikörper als Kontrolle analysiert.

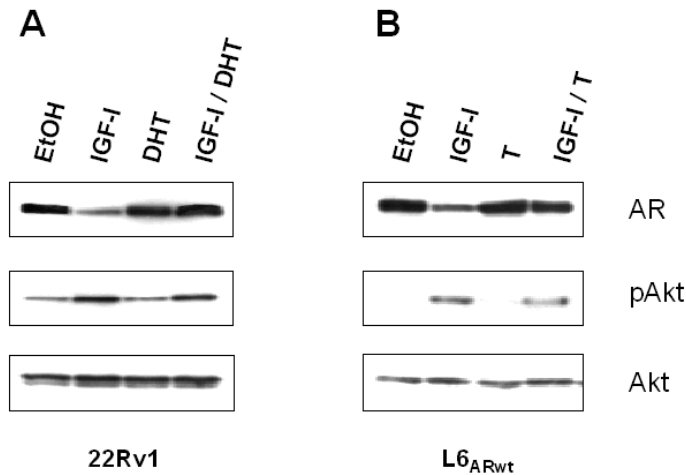
Während die in Abbildung 4.19A aufgeführten *Western-blot* Ergebnisse der „basic-X-basic“-Punktmutanten des N- und C-Terminus des Androgenrezeptors keinen Einfluss hinsichtlich der Androgenrezeptor-Reduzierung aufweisen, zeigen die verwendeten „basic-X-basic“-Kombinationsmutanten keine Androgenrezeptor-Degradation mehr. Bereits mit den Kombinationsmutanten AR(R100A, R788A) und AR(R210A, R788A), die jeweils nur ein „basic-X-basic“-Motiv sowohl im N- als auch im C-Terminus unterdrückt haben, ist eine geschwächte Androgenrezeptor-Reduzierung zu beobachten (s. Abb. 4.19B). Mit den Kombinationsmutanten, die im N-Terminus ein „basic-X-basic“-Motiv und im C-Terminus zwei dieser Motive zerstören, ist gar keine Degradation durch IGF-I mehr zu verzeichnen.

Die eingeführten Mutationen besitzen zwar keinen Effekt in Hinsicht auf das Bindungsverhalten zwischen Androgenrezeptor und PI3-Kinase, üben aber einen deutlichen Einfluss auf die Wachstumsfaktor-vermittelte Androgenrezeptor-Degradation aus.

### **4.6 Wirkung von Androgenen auf die IGF-I-vermittelte negative Regulation des Androgenrezeptors**

Da bisher der Effekt von IGF-I nur in Abwesenheit von Hormon untersucht wurde, ist es außerdem erforderlich, den Einfluss von Androgenen auf die IGF-I-induzierte Reduzierung des Androgenrezeptor-Proteins zu betrachten. Zum einen wurde die Prostatakrebszelllinie 22Rv1, die den Androgenrezeptor endogen exprimiert und zum anderen die Skelettmuskelzelllinie L6, die stabil mit dem Androgenrezeptor-Wildtyp (pSG5ARwt) transfiziert wurde, untersucht. Während die 22Rv1 Zellen zusätzlich mit DHT bzw. der Kombination IGF-I/DHT behandelt wurden, erfolgte die Überprüfung der L6<sub>ARwt</sub> Zellen mit Testosteron (T) und der Kombination IGF-I/T, da Testosteron für Skelettmuskelzellen das spezifischere Hormon darstellt (s. Abb. 4.20).



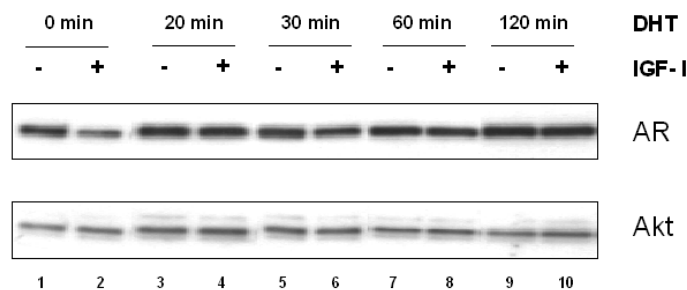


**Abb. 4.20: IGF-I-induzierte Degradation des Androgenrezeptor-Proteins. (A)** 22Rv1 Zellen wurden für 24 h mit IGF-I (20 ng/ml), DHT ( $10^{-7}$  M) und der Kombination IGF-I/DHT oder nur mit dem Lösungsmittel behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und lysiert. Das Gesamtzelllysat wurde mittels *Western-blot*-Analyse und einem spezifischen Androgenrezeptor-Antikörper, einem phospho-Akt (Ser473) und einem Akt-Antikörper als Kontrolle analysiert. **(B)** Stabil mit dem ARwt transfizierte L6 Skelettmuskelzellen wurden wie unter (A) beschrieben ebenfalls für 24 h mit IGF-I (20 ng/ml), T (Testosteron) ( $10^{-7}$  M) und IGF-I/T behandelt und anschließend geerntet und lysiert. Die Durchführung der *Western-blot*-Analyse erfolgte mit den unter (A) verwendeten Antikörpern.

Die *Western-blot*-Analyse zeigt, dass der Wachstumsfaktor IGF-I Akt phosphoryliert und die Menge an Androgenrezeptor-Protein reduziert. Dieser Effekt konnte sowohl in der Prostatakrebszelllinie 22Rv1, die den Androgenrezeptor endogen exprimiert, als auch in der stabil mit dem Androgenrezeptor-Wildtyp transfizierten Skelettmuskelzelllinie L6 beobachtet werden. Durch die Verwendung der Skelettmuskelzellen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der IGF-I-induzierte Proteinabbau des Androgenrezeptors nicht Gewebe-spezifisch nur auf Prostatakrebszellen beschränkt ist, sondern auch in anderen Androgenrezeptor-relevanten Geweben wie Muskelzellen auftritt (Abb. 4.20B). Sowohl in den Prostatakrebszellen als auch in den Skelettmuskelzellen wird durch gleichzeitige Zugabe des Gewebe-spezifischen Androgens zum Wachstumsfaktor IGF-I der Degradationseffekt des Androgenrezeptors aufgehoben. Auch mit dem jeweiligen Androgen allein ist kein Proteinabbau des Androgenrezeptors zu verzeichnen. Dies verdeutlicht, dass die Bindung des Hormons an den Androgenrezeptor und der daraus resultierenden Konformationsänderung oder der veränderte Phosphorylierungsstatus des Androgenrezeptors (Zhu *et al.*,

2001; Lee und Chang, 2003) möglicherweise als Schutz vor der Degradation dient.

Um den im vorherigen Experiment festgestellten Androgeneffekt auf die Degradation des Androgenrezeptors hinsichtlich seiner zeitlichen Wirkung näher zu untersuchen, wurden 22Rv1 Zellen für 2,5 h mit IGF-I (20 ng/ml) behandelt, um den Abbauprozess zu initiieren. Eine sich daran anschließende DHT-Zugabe für 20, 30, 60 und 120 Minuten sollte zeigen, wie schnell die Androgenbehandlung die Degradation blockieren kann.



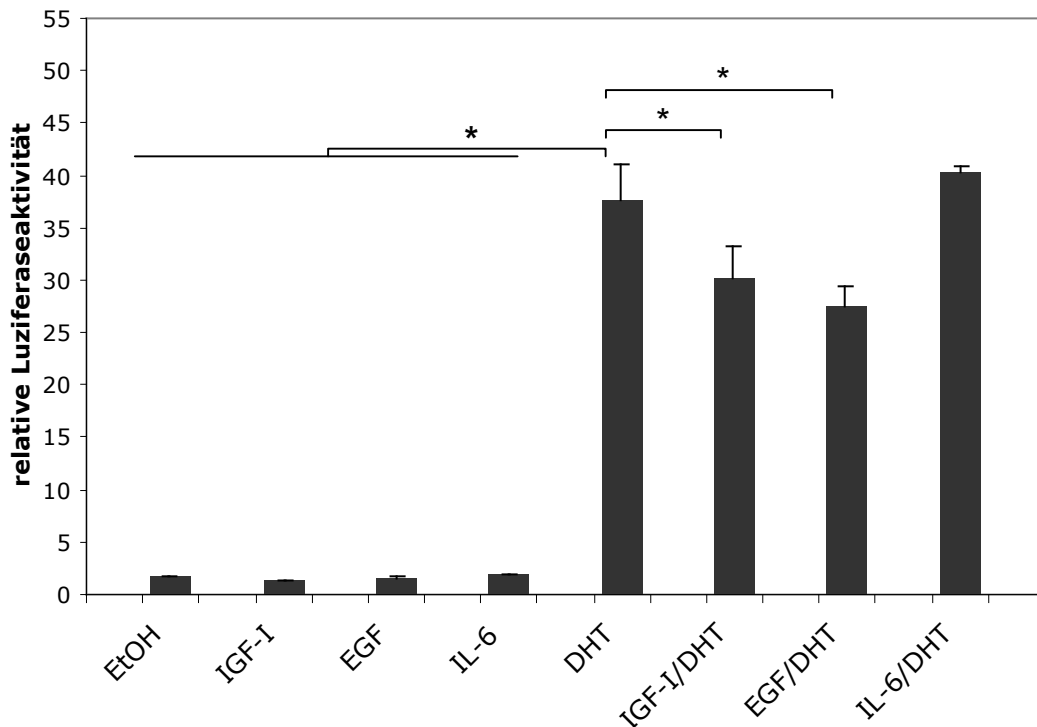
**Abb. 4.21: Zeitliche Wirkung einer kombinierten Wachstumsfaktor- und Androgenzugabe.** 22Rv1 Zellen wurden für 2,5 h mit IGF-I (20 ng/ml) oder nur mit dem Lösungsmittel behandelt. Danach wurde für 0, 20, 30, 60 und 120 min DHT ( $10^{-7}$  M) zu den Zellen gegeben und diese geerntet und lysiert. Das Gesamtzelllysate wurde mittels *Western-blot*-Analyse und einem spezifischen Androgenrezeptor-Antikörper und einem Akt-Antikörper als Kontrolle analysiert.

Die mit IGF-I induzierten 22Rv1 Zellen zeigten bereits nach 2,5 h eine deutliche Reduzierung der Androgenrezeptor-Proteinmenge (Vergleich Spur 1 und 2, Abb. 4.21). Die zusätzlich daraufhin mit DHT behandelten Zellen zeigten schon nach 20 min einen klaren Rückgang des Abbauprozesses (Vergleich Spur 2 und 4, Abb. 4.21). Das Ergebnis dieser *Western-blot*-Analyse weist auf einen sehr schnellen Androgeneffekt hin, der den Androgenrezeptor vor einem weiteren Proteinabbau schützt.

## 4.7 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Transkriptionsaktivität des Androgenrezeptors

Basierend auf der Beobachtung, dass sich infolge der Zugabe von IGF-I die Androgenrezeptor-Proteinmenge signifikant reduziert, stellt sich die Frage, ob die Wachstumsfaktoren auch Einfluss auf die Funktionalität des Androgenrezeptors ausüben. Da der Androgenrezeptor als ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor die Transkription spezifischer Zielgene über eine direkte Interaktion mit regulatorischen Sequenzen in der DNA (Truss und Beato, 1993) vermittelt, wurde der Einfluss der Wachstumsfaktoren durch die Verwendung des Luziferase-Reporter-Gen-Assays auf die transkriptionelle Aktivität des Androgenrezeptors analysiert. Bei diesem Assay dient das Enzym Luziferase als Reporter-Gen, welches sich auf dem Plasmid pGL3 MMTV-luc befindet und unter der Kontrolle des MMTV-Promotors (*mouse mammary tumor virus*) steht. Das Promotor-Luziferase-Konstrukt pGL3MMTV-luc wurde zusammen mit dem Androgenrezeptor-Expressionsvektor pSG5ARwt in die Prostatakarzinomzelllinie DU145 transfiziert, da diese Zellen keine endogene Expression des Androgenrezeptors aufweisen. Durch die Zugabe von DHT bindet der Androgenrezeptor im Komplex mit dem Hormon an die Androgen-responsiblen Elemente (ARE) des MMTV-Promotors und initiiert dadurch die Transkription des Luziferase-Reportergens. Die Menge an exprimierter Luziferase ist direkt proportional zu der bei Hinzugabe von Luziferin freiwerdenden Lichtmenge, die anschließend quantitativ ermittelt wurde.

Zunächst wurde untersucht, ob IGF-I einzeln oder in Kombination mit DHT einen Einfluss auf die Androgenrezeptor-Transkriptionsaktivität hat. Dieser Effekt wurde ebenfalls für EGF und IL-6 untersucht, die gleichermaßen eine Reduzierung des Androgenrezeptor-Proteins hervorrufen (s. Abb. 4.22).



**Abb. 4.22: Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Androgenrezeptor-Transkriptionsaktivität.**  $1,5 \times 10^5$  DU145 Zellen wurden mit Hilfe des Transfektionsreagenzes *FuGENE*<sup>®</sup>6 (Roche Diagnostics, Mannheim) mit jeweils 1 µg des Promotor-Luziferase-Konstruktes (pGL3 MMTV-luc) sowie 0,05 µg des Expressionsvektors pSG5ARwt und 0,2 µg pTK-Renilla-luc cotransfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen mit IGF-I (20 ng/ml), EGF (10 ng/ml), IL-6 (20 ng/ml), DHT ( $10^{-9}$  M) und verschiedenen Kombinationen oder nur mit dem Lösungsmittel für 24 h behandelt und anschließend mit dem Lysis-Puffer der Firma Promega (Mannheim) lysiert. Die Aktivität des MMTV-Promotors wurde durch Messung der Luziferase-Menge luminometrisch bestimmt (Luminometer 1420 Luminescence Counter VICTOR<sup>TM</sup>Light (PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim)). Die Menge der Luziferase ist abhängig von der Aktivierung des zu untersuchenden Promotors, unter dessen Kontrolle das Reportergen steht. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen. Das Plasmid pTK-Renilla-luc wurde als Kontrolle der Transfektionseffizienz cotransfiziert. \* entspricht  $p < 0,05$ . Die p-Werte wurden mit dem ungepaartem t-Test nach Student ( $n=3$ ) ermittelt.

Die mit der Promotoraktivität korrelierende Expression des Reportergenproduktes wurde auf Einfluss durch die Wachstumsfaktoren IGF-I, EGF und IL-6 untersucht. Es konnte zwischen den behandelten DU145 Zellen mit IGF-I, EGF oder IL-6 allein und den unbehandelten Zellen keine Unterschiede in der Transaktivierung des Androgenrezeptors festgestellt werden. Demgegenüber steht eine deutliche Aktivierung des Androgenrezeptors um das 37-fache nach

Zugabe von 1 nM DHT ( $10^{-9}$  M). In Gegenwart von Wachstumsfaktoren zusammen mit DHT konnte mit den Kombinationen IGF-I/DHT und EGF/DHT eine statistisch signifikant geringere transkriptionelle Aktivität des Androgenrezeptors im Vergleich zu DHT allein gezeigt werden. In Kombination mit dem Hormon ist eine reprimierende Wirkung durch die Wachstumsfaktoren IGF-I und EGF auf die transkriptionelle Aktivität zu beobachten. Lediglich die Kombinationszugabe IL-6/DHT wies eine ähnlich hohe Transaktivierung des Rezeptors wie mit DHT allein auf. Obwohl IGF-I, EGF und IL-6 in gleichem Maße die Transaktivierung des Androgenrezeptors herunterregulieren, gibt es einen Unterschied wenn DHT hinzugefügt wird.



## 5 Diskussion

Androgene sind entscheidende Regulatoren für die Entwicklung, das Wachstum und die Differenzierung der Prostata, spielen aber auch eine wesentliche Rolle in der Entstehung und Progression des primären Prostatakarzinoms. Da die Wirkung der Androgene über die Bindung und Aktivierung des Androgenrezeptors vermittelt wird, ist der Androgenentzug und die Antiandrogentherapie, also die Blockade des Androgenrezeptors, eine bevorzugte Behandlungsmethode des Prostatakarzinoms. Der zunächst erfolgreiche Verlauf der Therapie bei 80 % der Patienten wird nach durchschnittlich zwei Jahren durch ein androgenunabhängiges Wachstum der Prostatakrebszellen blockiert und führt zu einer erneuten Tumorprogression, was durch eine erhöhte PSA-Konzentration im Serum gekennzeichnet ist (Ripple *et al.*, 1999). Die derzeitigen therapeutischen Methoden gegen die fortgeschrittenen Stadien des humanen Prostatakarzinoms sind eher lindernd als heilend, wobei die durchschnittliche Überlebensdauer von Patienten mit einem hormonrefraktären Prostatakarzinom etwa 12 Monate beträgt (Trachtenberg, 2001). Die molekularen Mechanismen, die von einem androgensensitiven zu einem androgen-unabhängig wachsenden Prostatakarzinom führen, sind jedoch noch nicht geklärt. Das Fehlschlagen der Androgenablation wird mit Modifikationen der Androgenrezeptor-Aktivität in Verbindung gebracht, die möglicherweise zum hormonunabhängigen Prostatakarzinom führen. Bekannt ist, dass auch im fortgeschrittenen Prostatakrebs der Androgenrezeptor eine entscheidende Rolle spielt und die Prostatakrebszellen von einem funktionellen Androgenrezeptor abhängig sind (Chen *et al.*, 2004; Isaacs und Isaacs, 2004), was durch den Nachweis des Androgenrezeptors in allen Stadien des Prostatakarzinoms bestätigt wurde (Visakorpi *et al.*, 1995; Koivisto *et al.*, 1997).

Die Mechanismen zur Erklärung der Entwicklung des androgenunabhängigen Prostatakarzinoms können in drei generelle Kategorien eingeteilt werden (Chen *et al.*, 2004). Die erste Kategorie beinhaltet die Amplifikation des Androgenrezeptor-Gens oder Punktmutationen hauptsächlich in der Hormonbindedomäne, die in bis zu 5 % bzw. 10 - 20 % der Prostatakarzinom-Fälle beschrieben werden, wobei diese häufiger in hormonunabhängigen als in hormonsensitiven Tumoren auftreten (Visakorpi *et al.*, 1995; Edwards *et al.*,

2005a). Diese Androgenrezeptor-Modifikationen führen zu Resistenzen durch Veränderung der Androgenrezeptor-Funktion, so dass auch andere Liganden außer DHT, z.B. Östrogen oder Hydrocortison, oder sogar Androgenrezeptor-Antagonisten wie Hydroxyflutamid als Agonisten des Androgenrezeptors fungieren (Veldscholte *et al.*, 1990; Matias *et al.*, 2000).

Die zweite Kategorie der hormonresistenten Mechanismen basiert auf der Umgehung von Signalwegen in der Tumorzelle, die die Proliferation fördern und die Apoptose inhibieren, so dass der Androgenrezeptor nicht mehr relevant für die Progression der Krankheit ist. Ein Beispiel ist die hochregulierte Expression des antiapoptotischen Bcl-2-Gens in späten Prostatakarzinom-Entwicklungsstadien (Raffo *et al.*, 1995; Catz und Johnson, 2003).

Die dritte Kategorie der Androgen-umgehenden Mechanismen umfasst die Kontrolle der Androgenrezeptor-Funktion durch posttranslationale Modifikationen, häufig über Phosphorylierung durch verschiedene Kinase-Kaskaden. Eine konstitutiv aktivierte MAPKinase- oder PI3-Kinase/Akt-Signalkaskade, die durch Onkogene wie z.B. HER2/Neu verursacht werden, führen ebenfalls zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung des Androgenrezeptors, was in einer vermehrten Rekrutierung von Androgenrezeptor-Cofaktoren und damit in einer erhöhten Transkriptionsaktivität des Androgenrezeptors resultiert (Craft *et al.*, 1999; Gioeli *et al.*, 2002; Edwards *et al.*, 2005b). Gleichfalls kann eine Veränderung der Balance zwischen Coaktivatoren und Corepressoren die Androgenrezeptor-Aktivität beeinflussen (Gregory *et al.*, 2001; Mestayer *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass der Androgenrezeptor alternative Aktivierungswege durch Kooperation mit anderen Signalwegen des zellulären Regulationsnetzwerkes benutzt und in Abwesenheit von Androgen durch Wachstumsfaktoren reguliert werden kann (Culig *et al.*, 1994).

## **5.1 Wachstumsfaktor-induzierte negative Regulation des Androgenrezeptor-Proteins und deren Aufhebung durch Androgen**

Der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Einfluss des Wachstumsfaktors IGF-I auf den Androgenrezeptor zeigte in den drei unterschiedlichen Prostatakrebszelllinien PC-3, DU145 und 22Rv1 eine deutliche Reduzierung des Androgen-



rezeptor-Proteins um etwa 70 – 80 %. Dieser Effekt konnte ebenso mit den Wachstumsfaktoren EGF und IL-6 beobachtet werden. Der Proteinabbau wurde sowohl in den transient mit dem Androgenrezeptor-Wildtyp transfizierten Prostatakrebszelllinien PC-3 und DU145 als auch in den, den Androgenrezeptor endogen exprimierenden, Prostatakrebszellen 22Rv1 nachgewiesen. Die durch Wachstumsfaktoren induzierte Repression des Androgenrezeptor-Proteins konnte bereits nach zwei Stunden in der Prostatakarzinomzelllinie 22Rv1 festgestellt werden. Die Frage, ob diese Reduzierung der Androgenrezeptormenge auf Proteinebene oder bereits auf mRNA-Level stattfindet, wurde mit Hilfe der quantitativen *Real-time* PCR untersucht. Da sowohl IGF-I als auch die Kombination von IGF-I und DHT keinen signifikanten Einfluss auf die Expression des Androgenrezeptor-Gens besitzen, erfolgt die Herunterregulierung des Androgenrezeptors ausschließlich auf Proteinebene. Ein vergleichbarer Effekt wurde mit HB-EGF (*heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor*), einem Antagonisten des Androgenrezeptors, beobachtet, der ebenfalls eine reduzierte Androgenrezeptor-Proteinmenge bewirkt, ohne Einfluss auf die mRNA-Ebene auszuüben (Cinar *et al.*, 2005). Auch die Arbeitsgruppe um Lin konnte eine durch IGF-I und IL-6 hervorgerufene Androgenrezeptor-Degradation zeigen (Lin *et al.*, 2001 und 2002). An dieser Stelle wäre in nächsten Experimenten zu klären, ob eine *de novo* Proteinsynthese für die Wachstumsfaktor-vermittelte negative Regulation des Androgenrezeptors notwendig ist. Eine Vorbehandlung von LNCaP Zellen mit Cycloheximid, einem Hemmstoff der Proteinbiosynthese, zeigte mit HB-EGF, dass keine neue Proteinsynthese für den Degradationseffekt des Androgenrezeptors nötig war (Cinar *et al.*, 2005).

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass eine nachträgliche DHT-Behandlung von 22Rv1 Zellen, den zuvor durch IGF-I induzierten Androgenrezeptor-Proteinabbau, rückgängig machen kann. Da die Hormonzugabe bereits nach 20 Minuten nahezu die gleiche Proteinmenge des Androgenrezeptors bewirkt, wie ohne den IGF-I-vermittelten Proteinabbau des Androgenrezeptors, handelt es sich um einen sehr schnellen Androgeneffekt. Es ist bekannt, dass die Bindung des Hormons an den Androgenrezeptor zum einen zur Konformationsänderung des Androgenrezeptors führt und zum anderen den Androgenrezeptor an spezifischen Stellen phosphoryliert (Lee und Chang,

2003). Dieser spezielle Phosphorylierungszustand ist möglicherweise dafür verantwortlich, dass der Androgenrezeptor vor einem Abbau geschützt und stabilisiert wird. Zu den durch Androgen phosphorylierten Aminosäuren des Androgenrezeptors gehört Serin an Position 16, 81, 256, 308, 424, und 650 (Zhou *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 2001; Gioeli *et al.*, 2002). Die Aufhebung der IGF-I-induzierten Degradation des Androgenrezeptor-Proteins durch Androgenzugabe ist nicht Gewebe-spezifisch nur auf Prostatakarzinomzelllinien beschränkt, sondern konnte auch in stabil mit dem Androgenrezeptor-Wildtyp transfizierten Skelettmuskelzellen beobachtet werden.

## **5.2 PI3-Kinase-vermittelter proteasomaler Androgenrezeptor-Abbau**

Die Androgenrezeptormenge wird hauptsächlich über zwei proteolytische Abbauwege posttranslational kontrolliert. Zum einen über das 26S Proteasomen-System, das sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von Hormon stattfindet, zum anderen über die Bindung von PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome 10*) an den Androgenrezeptor, das die Rekrutierung der Caspase 3 ermöglicht (Lin *et al.*, 2004). In einem nächsten Schritt wurde deshalb der vermittelnde Abbauweg näher untersucht. Durch die Verwendung des Proteasomen-Inhibitors Lactacystin konnte eine IGF-I-induzierte proteasomale Degradation des Androgenrezeptors bestätigt werden. Studien durch Lin und Kollegen deuten darauf hin, dass eine Androgenrezeptor-Degradierung über die Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalweges vermittelt wird. Sie postulieren eine durch Wachstumsfaktoren und Zytokine Phosphorylierungs-abhängige Androgenrezeptor-Ubiquitinierung- und Degradierung durch die Mdm2 E3-Ligase-Aktivität, wobei die Phosphorylierung des Androgenrezeptors und Mdm2 durch Akt essentiell für die Degradation des Androgenrezeptors ist (Lin *et al.*, 2002). Diese Ergebnisse konnten nur zum Teil durch eigene Experimente belegt werden. So wurde zwar der PI3-Kinase-Signalweg mit Hilfe des PI3-Kinase-Inhibitors Wortmannin als vermittelnder Signaltransduktionsweg bestätigt. Eine Involvierung der durch die PI3-Kinase aktivierten Proteinkinase Akt konnte jedoch nicht beobachtet werden, da die durch spezifische siRNA unterdrückte Expression von Akt1 und Akt2 keine

Beeinträchtigung des Androgenrezeptor-Proteinabbaus zeigte. Die Phosphorylierung des Androgenrezeptors durch Akt an Position Ser-210 und Ser-790 unterdrückt die Androgenrezeptor-Transaktivierung durch Inhibierung der Androgenrezeptor-ARA70-Interaktion (Lin *et al.*, 2001). Die Inhibierung der Bindung zwischen Androgenrezeptor und ARA70, einem Coaktivator des Rezeptors, verhindert die Translokation des Androgenrezeptors in den Zellkern (Hu *et al.*, 2004) und ermöglicht auf diese Weise den Abbau im Zytoplasma. In diesen Studien wurde die Phosphorylierung des Androgenrezeptors durch die PI3-Kinase nicht analysiert. Experimente, die den Phosphorylierungsstatus des Androgenrezeptors nach Wachstumsfaktor-Behandlung untersuchen, z.B. mit Phospho-Antikörpern der Akt-Konsensussequenz (RXRXX(S/T)), von der eine im N- und eine im C-Terminus des Androgenrezeptor lokalisiert ist (Alessi *et al.*, 1996), würden Gewissheit über die Rolle von Akt hinsichtlich der Androgenrezeptor-Degradierung bringen. Da es jedoch in dieser Arbeit keinen Hinweis für eine Phosphorylierung des Androgenrezeptors durch Akt gab, wurde eine Regulation *upstream* von Akt in Betracht gezogen. Eine direkte Involvierung der PI3-Kinase ist dabei vorstellbar und wurde durch die Verwendung des PI3-Kinase-Inhibitors Wortmannin, was zu einer deutlichen Reduzierung des Androgenrezeptor-Proteinabbaus führte, bereits bestätigt.

### **5.3 Interaktion der p85-Untereinheit der PI3-Kinase mit dem Androgenrezeptor**

Die Hypothese, dass die PI3-Kinase selbst, durch die direkte Interaktion mit dem Androgenrezeptor, den Abbau des Rezeptors reguliert, wird gestützt durch die Tatsache, dass eine solche Bindung zwischen dem Androgenrezeptor und der p85-regulatorischen Untereinheit der PI3-Kinase bereits beobachtet wurde (Sun *et al.*, 2003; Baron *et al.*, 2004). Über welche Domänen diese Bindung realisiert wird, gibt es jedoch widersprüchliche Ansichten. Die Arbeitsgruppe um Sun beschrieb eine N-terminale Bindung am Androgenrezeptor mit der C-SH2-Domäne der p85-Untereinheit der PI3-Kinase (Sun *et al.*, 2003), während Baron und Kollegen zusätzlich zur C-SH2-Domäne auch die SH3-Domäne als Interaktionsstelle lokalisierten (Baron *et al.*, 2004). Eine ligandenabhängige Bindung über die SH3-Domäne der p85-Untereinheit an die prolinreiche Region im N-

Terminus des Androgenrezeptors, wie es für die Kinase Src in einigen Brust- und Prostatakrebszelllinien beobachtet wurde (Migliaccio *et al.*, 2000), aber auch eine Bindung über die SH2-Domänen an Phosphotyrosinreste in charakteristischen Aminosäuresequenz-Motiven, ist möglich. Einige Tyrosin-Phosphorylierungsstellen des Androgenrezeptors konnten erst vor kurzem durch Guo und Kollegen identifiziert werden. Sie postulieren eine signifikant erhöhte, durch Wachstumsfaktoren wie EGF, Heregulin und IL-6 induzierte Androgenrezeptor-Tyrosin-Phosphorylierung in hormonrefraktären Prostata-tumoren (Guo *et al.*, 2006). Speziell für die Kinase Src konnte die Phosphorylierungsstelle Y534 auf dem Androgenrezeptor dokumentiert werden (Guo *et al.*, 2006).

Aufgrund der Diskrepanz in den unterschiedlichen Ergebnissen der Arbeitsgruppen hinsichtlich der Interaktion von Androgenrezeptor und PI3-Kinase und der möglichen Bedeutung der Interaktionsdomänen wurden die früheren Ergebnisse überprüft. Unter Verwendung verschiedener GST-Fusionsproteine, welche die einzelnen Domänen der p85-Untereinheit repräsentierten, wurden Interaktionsstudien mit dem Androgenrezeptor-Wildtyp durchgeführt. Auf diese Weise konnte die Interaktion zwischen der p85-Untereinheit der PI3-Kinase mit dem Androgenrezeptor bestätigt und eine sehr deutliche Bindung mit der C-SH2-Domäne der PI3-Kinase festgestellt werden. Eine Bindung, die durch die SH3-Domäne vermittelt wird, konnte nicht beobachtet werden. Des Weiteren ergaben die Interaktionsstudien mit Deletionsmutanten des Androgenrezeptors, dass die p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase sowohl mit dem N-Terminus als auch mit dem C-Terminus des Androgenrezeptors interagieren kann. Dieses Resultat deutet daraufhin, dass sich mindestens zwei getrennte C-SH2-Bindungsmotive auf dem Androgenrezeptor befinden, da die Intensität der Bindung zu beiden Domänen ähnlich stark ausgeprägt ist. Weiterhin handelt es sich bei der Bindung zwischen Androgenrezeptor und der PI3-Kinase um eine ligandenunabhängige Interaktion, da sowohl eine Bindung mit Hormon als auch ohne Hormon zu beobachten ist, wobei die Interaktion nach DHT-Zugabe deutlich schwächer ausgeprägt ist. Diese reduzierte Bindung könnte auf die veränderte Konformation des Androgenrezeptors nach der Hormonbindung zurückzuführen sein. Da es nach der Bindung des Liganden an die Hormonbindedomäne des Androgenrezeptors zu einer Konformationsveränderung

kommt (Wurtz *et al.*, 1996), ist möglicherweise die Bindungsstelle für die PI3-Kinase an den Androgenrezeptor nur eingeschränkt zugänglich, was in einer geschwächten Bindungsintensität resultiert. Auch die Tatsache, dass die p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase ebenso wie der spezifische Ligand DHT an die Hormonbindedomäne des Androgenrezeptors binden und es eventuell eine Überlappung der Bindungsstellen gibt, könnte ein Grund für die abgeschwächte Interaktion sein. Diese unterschiedlichen Bindungsintensitäten sind jedoch nicht mit allen Deletionsmutanten des Androgenrezeptors zu beobachten. AR $\Delta$ HBD, eine Androgenrezeptormutante, welche ausschließlich den N-Terminus des Rezeptors repräsentiert, zeigt keine veränderte Interaktion mit der PI3-Kinase nach Hormonzugabe. Demnach ist das veränderte Bindungsverhalten auf die Interaktionsstelle in der Hormonbindedomäne zurückzuführen.

Unter physiologischen Bedingungen ist zum einen eine Bindung mehrerer PI3-Kinase-Moleküle an den Androgenrezeptor denkbar, zum anderen aber könnte die p85-C-SH2-Domäne auch die Fähigkeit besitzen, gleichzeitig beide Bindungsstellen auf dem Androgenrezeptor zu besetzen. Dies setzt voraus, dass hinsichtlich der Tertiärstruktur N- und C-Terminus des Androgenrezeptors räumlich sehr nahe liegen, um eine gleichzeitige Bindung der PI3-Kinase an N- und C-Terminus zu ermöglichen. Ein ähnliches Bindungsverhalten zum Androgenrezeptor weist z.B. das Cochaperon Bag-1L auf, das ebenfalls mit dem N-Terminus wie auch mit dem C-Terminus des Androgenrezeptors interagiert (Shatkina *et al.*, 2003).

Die N- und C-terminalen Bindungsstellen für die p85-C-SH2-Domäne können aber auch als alternative Bindungsstellen verstanden werden. Dies setzt jedoch voraus, dass N- und C-Terminus des Androgenrezeptors ein gemeinsames Bindungsmotiv für die C-SH2-Domäne aufweisen. Für eine nähere Charakterisierung dieser Bindungsdomänen wurden Peptidarrays durchgeführt. Mit dieser Methode kann die genaue Interaktionsregion auf Aminosäure-Ebene in einem Protein bestimmt werden (Kramer *et al.*, 1999, Frank *et al.*, 1996 und 2002; Landgraf *et al.*, 2004). Auf diese Art und Weise wurden sowohl der N- und C-Terminus des Androgenrezeptors als auch die p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase auf Interaktion überprüft. Um zusätzlich bis auf die Aminosäure genau die Bindungsstellen identifizieren zu können, wurden die im Peptidarray positiv auf Interaktion ermittelten Peptide einer Substitutionsanalyse unterzogen. Bei

einem solchen Alanin-Scan wird jede Aminosäure in der Peptidsequenz nacheinander durch Alanin ersetzt. Dabei wird deutlich, dass es sich an den Positionen, wo letztendlich keine Interaktion aufgrund des Aminosäure-Austausch mehr stattfinden kann, um eine essentielle Aminosäure handelt. In den durchgeführten Peptidarrays und den sich anschließenden Alanin-Substitutionen konnten so 18 Aminosäuren für den N-Terminus, sechs Aminosäuren für den C-Terminus des Androgenrezeptors und 11 Aminosäuren für die p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase identifiziert werden. Aufgrund der umfangreichen Anzahl von 18 Aminosäuren im N-Terminus und der Tatsache, dass bereits zahlreiche Interaktionspartner mit ihrem jeweiligen Bindungsmotiv für den C-Terminus des Androgenrezeptor bekannt sind, lag das Hauptaugenmerk zunächst auf die in der Hormonbindedomäne des Androgenrezeptors gefundenen Bindungsstellen.

Ein notwendiges Kriterium dafür, dass es sich bei den identifizierten Aminosäuren um Bindungsstellen handelt, ist, dass sie an der Proteinoberfläche lokalisiert und so für Bindungen zu anderen Proteinen zugänglich sind. Dies konnte anhand der computerunterstützten Anordnung der identifizierten Aminosäuren in die dreidimensionale Darstellung der Hormonbindedomäne des Androgenrezeptors durch Prof. Dr. Moras und Dr. Ruff vom *Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology* der *Illkirch Louis Pasteur University* in Strasbourg bestätigt werden. An die carboxyterminale Domäne des Rezeptors binden neben dem spezifischen Liganden DHT auch zahlreiche Hitzeschockproteine, unter anderem Hsp90 (Smith und Toft, 1993) und verschiedene Coaktivatoren, wie ARA54 (Kang *et al.*, 1999) oder ARA55 (Fujimoto *et al.*, 1999). Ein Vergleich mit der Bindungsoberfläche der AF-2 Transaktivierungsdomäne ergab lediglich mit der Aminosäure Lysin an Position 720 eine Übereinstimmung und verdeutlicht, dass es sich um eine neue noch nicht charakterisierte Bindungsoberfläche handeln muss. Diese Sequenzanalyse erfolgte, da aus unterschiedlichen Quellen bekannt ist, dass verschiedene Cofaktoren über das  $\alpha$ -helikale Motiv FXXLF (F=Phenylalanin, X=beliebige Aminosäure) an die AF-2 Domäne binden (He *et al.*, 2000; He und Wilson, 2003; Lee und Chang, 2003), aber auch die intramolekulare Interaktion mit dem N-Terminus, der ein solches Motiv besitzt, realisiert wird (Langley *et al.*, 1998; He *et al.*, 2000).

Um die Relevanz der identifizierten Bindungsstellen in der Hormonbindedomäne des Androgenrezeptors zu überprüfen, ergab ein Vergleich mit der Datenbank für Androgenrezeptormutationen ([www.mcgill.ca/androgenb/](http://www.mcgill.ca/androgenb/)), dass bereits fünf dieser Aminosäuren als Mutationen des Androgenrezeptors bekannt sind und einen klinischen Phänotyp aufweisen, der über unterschiedliche Formen des Androgeninsensitivitätssyndroms bis hin zu Prostatakrebs reicht. Der klinische Phänotyp dieser Mutanten ist jedoch nicht auf die Interaktion mit der PI3-Kinase zurückzuführen, da die generierten Punktmutanten in Interaktionsstudien weiterhin Bindung zur p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase aufwiesen. Dennoch verdeutlichen die Mutationen mit bekanntem Krankheitsbild die Relevanz der identifizierten Aminosäuren, deren funktionelle Bedeutung ebenfalls untersucht werden sollte. Dazu wurden sowohl Einzelmutanten als auch Doppel- und Mehrfachmutanten des N- und C-Terminus des Androgenrezeptors durch gezielte Punktmutagenese generiert. Die Überprüfung der Mutanten auf Interaktion zur p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase in *GST-pull down*-Experimenten konnte die unterdrückte Interaktion in den vorangegangenen Alanin-Substitutionen nicht bestätigen, da immer noch Bindung beobachtet werden konnte. Aufgrund der Tatsache, dass die Androgenrezeptor-Mutanten lediglich immer nur die Bindungsstellen auf einer Domäne repräsentieren und damit die Interaktion zwischen Androgenrezeptor und PI3-Kinase nicht unterbunden werden kann, lässt dies die Möglichkeit einer gleichzeitigen Bindung der p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase sowohl an den N- als auch an den C-Terminus des Androgenrezeptors in Betracht kommen.

#### **5.4 Phosphotyrosin-unabhängige Interaktion der p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase und dem Androgenrezeptor**

Sequenzanalysen von N- und C-Terminus des Androgenrezeptors ergaben ein gemeinsam vorhandenes „basic-X-basic“-Motiv. Eine durch Anderson und Kollegen beobachtete Bindung der p85-SH2-Domänen der PI3-Kinase mit der Kinase A-Raf beschreibt eine Phosphotyrosin-unabhängige Interaktion über dieses Motiv (King *et al.*, 2000; Fang *et al.*, 2002). Die Untersuchung, ob es sich bei der Interaktion zwischen dem Androgenrezeptor und der p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase um eine Phosphotyrosin-abhängige oder -unabhängige

Bindung handelt, konnte durch mehrere Experimente als Phosphotyrosin-unabhängige Interaktion ermittelt werden. Zum einen ergab der Vergleich der auf der p85-C-SH2-Domäne identifizierten Aminosäuren mit dem Bindungsmotiv für phosphorylierte Tyrosinreste nur mit zwei von insgesamt 11 Aminosäuren eine Übereinstimmung. Zum anderen zeigt die Mutation von Arginin an Position 36 zu Methionin durch gezielte Punktmutagenese, wobei die Phosphotyrosin-Bindungstasche auf der p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase zerstört wird (Siegal *et al.*, 1998), in *pull down*-Experimenten nach wie vor Interaktion zum Androgenrezeptor.

Da eine Phosphotyrosin-unabhängige Bindung zwischen Androgenrezeptor und PI3-Kinase vorliegt und mehrere der in den vorangegangenen Peptidarrays identifizierten Aminosäuren Bestandteil solcher „basic-X-basic“-Motive sind, wurden Kombinationsmutanten erstellt, die jeweils ein oder mehrere dieser zerstörten Bindungsmotive sowohl im N- als auch im C-Terminus des Androgenrezeptors enthielten. Die Ergebnisse der sich daran anschließenden Interaktionsstudien zeigten jedoch immer noch Bindung mit der p85-C-SH2-Domäne. Die weiterhin bestehende Interaktion trotz zerstörter „basic-X-basic“-Motive im N- und C-Terminus des Androgenrezeptors könnte darauf hinweisen, dass die Bindung durch eines der anderen „basic-X-basic“-Motive im N-Terminus realisiert wird oder alle vorhandenen Motive gleichzeitig blockiert sein müssen.

Eine Überprüfung der Mutanten auf den Einfluss von IGF-I ergab mit den zwei Androgenrezeptor-Kombinationsmutanten AR(R100A, K720H, W741A, K777A, R788A) und AR(R210A, K720H, W741A, K777A, R788A), die jeweils eine Mutation im N-Terminus und vier Mutationen im C-Terminus des Androgenrezeptors aufweisen, in *Western-blot*-Analysen keinen IGF-I-induzierten Degradationseffekt des Androgenrezeptor-Proteins mehr. Da es sich bei den mutierten Aminosäuren des Androgenrezeptors hauptsächlich um basische Aminosäuren handelt, die unterschiedlichsten posttranslationalen Modifikationen wie Acetylierung, Ubiquitinierung sowie Sumoylierung unterliegen, ist ein verändertes Modifikationsmuster eine mögliche Erklärung für den Schutz des Androgenrezeptors vor einem Proteinabbau. Da sich das Motiv KLKK, welches der Acetylierung unterliegt in der *hinge*-Region des Androgenrezeptors befindet (Fu *et al.*, 2000) und auch die Ubiquitinierung und die Sumoylierungs-



stellen an Position Lys-385 und Lys-511 (Callewaert *et al.*, 2004) nicht von Mutationen betroffen sind, kommen diese Modifikationen als Begründung für den durch IGF-I induzierten, ausbleibenden Degradationseffekt des Androgenrezeptors nicht in Frage. Eine andere Erklärungsmöglichkeit besteht in der Zerstörung eines Phosphorylierungsmotives, da ein veränderter Phosphorylierungsstatus ebenfalls den Proteinabbau verhindern könnte. Obwohl bei der Kombinationsmutante AR(R100A, K720H, W741A, K777A, R788A) eine und bei der Mutante AR(R210A, K720H, W741A, K777A, R788A) zwei der Konsensussequenzen für die Phosphorylierung des Androgenrezeptors durch Akt zerstört wurden, spielt Akt bei diesem Degradationsprozess keine Rolle, da die Suppression von Akt in siRNA-Experimenten keinen Einfluss auf den Androgenrezeptor-Proteinabbau zeigte. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass eine bisher unbekannte Funktion verändert wurde.

Diese Androgenrezeptor-Kombinationsmutanten erscheinen demzufolge von großem Interesse und sollten in weiteren Experimenten auf die transkriptionelle Aktivität des Androgenrezeptors untersucht werden.

## **5.5 Einfluss der Wachstumsfaktoren auf die transkriptionelle Aktivität des Androgenrezeptors**

Experimente mit dem Androgenrezeptor-Wildtyp zeigten hinsichtlich der Frage, welche Rolle die Wachstumsfaktoren in der Androgenrezeptor-vermittelten Transkription spielen, keinen Einfluss. Um die Wirkung der Wachstumsfaktoren auf die transkriptionelle Aktivität des Androgenrezeptors zu untersuchen, wurde ein Luziferase-Reportergen-Assay durchgeführt. Während die mit den Wachstumsfaktoren IGF-I, EGF und IL-6 behandelten 22Rv1 Zellen keine transkriptionelle Aktivität aufwiesen, zeigte die Behandlung der Zellen mit DHT eine ca. 37-fach erhöhte Transaktivierung des Androgenrezeptors. Obwohl IGF-I, EGF und IL-6 im gleichen Maße die Transkriptionsaktivität des Androgenrezeptors herunterregulieren, gibt es Unterschiede, wenn geringe Menge von DHT ( $10^{-9}$  M) hinzukommen. Die Zugabe von Wachstumsfaktoren mit DHT führte mit IGF-I und EGF zu einem statistisch signifikant reprimierenden Effekt im Vergleich zu DHT allein. Lediglich die Kombination IL-6/DHT zeigte keinen Unterschied in der Transaktivierung zur DHT-Behandlung, was auf jeden Fall in

weiteren Untersuchungen genauer überprüft werden sollte. Auch unterschiedliche Konzentrationen sowohl der Wachstumsfaktoren als auch von DHT könnten ebenfalls mehr Aufschluss über den Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Androgenrezeptor-vermittelte Transkription im hormonrefraktären Prostatakarzinom geben.

Die Androgenrezeptor-vermittelte Transkription ist ein zyklischer Prozess, in dem der Rezeptor mit Hilfe von Coaktivatoren die Transkription von Zielgenen induziert und anschließend durch den Ubiquitin-vermittelten proteasomalen Abbau degradiert wird. Erst der Androgenrezeptor-Abbau macht einen weiteren Zyklus der Transaktivierung möglich (Kang *et al.*, 2002). Dies verdeutlicht, dass die Kopplung der Transkription an den Ubiquitin-vermittelten Abbau der Transkriptionsfaktoren ein Mechanismus für die Begrenzung der Transkription sein könnte, der dafür zuständig ist, dass die Transkription beendet werden kann, wenn sie nicht mehr erwünscht ist, d.h. in Abwesenheit von Androgen (Thomas und Tyers, 2000). Ein durch Wachstumsfaktoren erhöhter Androgenrezeptor-Proteinabbau führte jedoch in den eigenen Experimenten nicht zu einer erhöhten Transaktivierung des Androgenrezeptors. Die in dieser Arbeit erhaltenen Resultate gleichen Studien, die eine PI3-Kinase/Akt-Aktivierung durch Wachstumsfaktoren aufweisen, was zu einer inhibierten transkriptionellen Aktivität des Androgenrezeptors und damit zur Suppression einiger Androgenrezeptor-Zielgene führt (Lin *et al.*, 2001, Lin *et al.*, 2002). Verschiedene Publikationen postulieren jedoch gegenteilige Ergebnisse. So konnte z.B. IGF-I, KGF, EGF, Neuropeptide HER-2/Neu und IL-6 die Transkription des Androgenrezeptors in Transfektions-Experimenten erhöhen (Culig *et al.*, 1994 und 1997; Hobisch *et al.*, 1998; Craft *et al.*, 1999; Yeh *et al.*, 1999; Jongsma *et al.*, 2000). Eine genaue Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse kann an dieser Stelle jedoch nicht gegeben werden.

## **5.6 Einfluss der Wachstumsfaktoren auf eine mögliche weitere Funktion des Androgenrezeptors**

Da die Wachstumsfaktoren IGF-I, EGF und IL-6 keinen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität des Androgenrezeptors zeigen, sondern die Degradation des Androgenrezeptor-Proteins zur Folge haben, sollte die Wirkung der Wachs-

tumsfaktoren auch auf eine mögliche weitere Funktion des Rezeptors diskutiert werden. So konnten Litvinov und Kollegen in verschiedenen Studien zeigen, dass der Androgenrezeptor neben seiner Funktion als Transkriptionsfaktor auch als Lizenzfaktor (*licensing factor*) für die DNA-Replikation in androgensensitiven Prostatakrebszellen fungiert (Litvinov *et al.*, 2006). Ein Lizenzfaktor wird während der Replikation aufgebraucht und nur dadurch, dass in der Mitose ein neuer Faktor aus dem Zytoplasma in den Zellkern gelangt, findet eine Reaktivierung und damit eine Kontrolle der eukaryontischen Replikation statt. Es konnte festgestellt werden, dass die Androgenrezeptor-Proteinmenge sowohl innerhalb als auch zwischen den einzelnen Zellzyklusphasen schwankt. Dabei wird der Androgenrezeptor während der Mitose durch einen Proteasomen-abhängigen Abbauprozess degradiert, um eine Reinitiation der DNA-Replikation für einen neuen Zellzyklus zu ermöglichen (Litvinov *et al.*, 2006; Vander Griend *et al.*, 2007). Für den Östrogenrezeptor konnte ebenfalls der Einfluss auf die DNA-Replikation nachgewiesen werden (Laganieri *et al.*, 2005). Diese Daten liefern für einige ungeklärte Beobachtungen in Prostatakrebszellen neue Erklärungsansätze.



## 6 Referenzen

- Alen, P., F. Claessens, et al. (1999). "Interaction of the putative androgen receptor-specific coactivator ARA70/ELE1alpha with multiple steroid receptors and identification of an internally deleted ELE1beta isoform." Mol Endocrinol **13**(1): 117-28.
- Alessi, D. R., M. Andjelkovic, et al. (1996). "Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1." Embo J **15**(23): 6541-51.
- Avila, D. M., C. M. Wilson, et al. (2002). "Immunoreactive AR and genetic alterations in subjects with androgen resistance and undetectable AR levels in genital skin fibroblast ligand-binding assays." J Clin Endocrinol Metab **87**(1): 182-8.
- Baron, S., M. Manin, et al. (2004). "Androgen receptor mediates non-genomic activation of phosphatidylinositol 3-OH kinase in androgen-sensitive epithelial cells." J Biol Chem **279**(15): 14579-86.
- Bartlett, J. M., D. Brawley, et al. (2005). "Type I receptor tyrosine kinases are associated with hormone escape in prostate cancer." J Pathol **205**(4): 522-9.
- Beato, M., S. Chavez, et al. (1996). "Transcriptional regulation by steroid hormones." Steroids **61**(4): 240-51.
- Beato, M., P. Herrlich, et al. (1995). "Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot." Cell **83**(6): 851-7.
- Benten, W. P., M. Lieberherr, et al. (1999a). "Functional testosterone receptors in plasma membranes of T cells." Faseb J **13**(1): 123-33.

- Benten, W. P., M. Lieberherr, et al. (1997). "Testosterone induces Ca<sup>2+</sup> influx via non-genomic surface receptors in activated T cells." FEBS Lett **407**(2): 211-4.
- Benten, W. P., M. Lieberherr, et al. (1999b). "Testosterone signaling through internalizable surface receptors in androgen receptor-free macrophages." Mol Biol Cell **10**(10): 3113-23.
- Berrevoets, C. A., P. Doesburg, et al. (1998). "Functional interactions of the AF-2 activation domain core region of the human androgen receptor with the amino-terminal domain and with the transcriptional coactivator TIF2 (transcriptional intermediary factor2)." Mol Endocrinol **12**(8): 1172-83.
- Blok, L. J., P. E. de Ruiter, et al. (1998). "Forskolin-induced dephosphorylation of the androgen receptor impairs ligand binding." Biochemistry **37**(11): 3850-7.
- Bonkhoff, H. and K. Remberger (1996). "Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model." Prostate **28**(2): 98-106.
- Boonyaratanakornkit, V., M. P. Scott, et al. (2001). "Progesterone receptor contains a proline-rich motif that directly interacts with SH3 domains and activates c-Src family tyrosine kinases." Mol Cell **8**(2): 269-80.
- Breeze, A. L., B. V. Kara, et al. (1996). "Structure of a specific peptide complex of the carboxy-terminal SH2 domain from the p85 alpha subunit of phosphatidylinositol 3-kinase." Embo J **15**(14): 3579-89.
- Buchanan, G., N. M. Greenberg, et al. (2001). "Collocation of androgen receptor gene mutations in prostate cancer." Clin Cancer Res **7**(5): 1273-81.
- Buchner, J. (1999). "Hsp90 & Co. - a holding for folding." Trends Biochem Sci **24**(4): 136-41.

- Burfeind, P., C. L. Chernicky, et al. (1996). "Antisense RNA to the type I insulin-like growth factor receptor suppresses tumor growth and prevents invasion by rat prostate cancer cells in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(14): 7263-8.
- Callewaert, L., G. Verrijdt, et al. (2004). "Differential effect of small ubiquitin-like modifier (SUMO)-ylation of the androgen receptor in the control of cooperativity on selective versus canonical response elements." Mol Endocrinol **18**(6): 1438-49.
- Carter, A. N. and C. P. Downes (1992). "Phosphatidylinositol 3-kinase is activated by nerve growth factor and epidermal growth factor in PC12 cells." J Biol Chem **267**(21): 14563-7.
- Cato, A. C., A. Nestl, et al. (2002). "Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways." Sci STKE **2002**(138): RE9.
- Catz, S. D. and J. L. Johnson (2003). "BCL-2 in prostate cancer: a minireview." Apoptosis **8**(1): 29-37.
- Chang, C., A. Saltzman, et al. (1995). "Androgen receptor: an overview." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **5**(2): 97-125.
- Chang, C. S., J. Kokontis, et al. (1988). "Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(19): 7211-5.
- Chavez, B., F. Vilchis, et al. (2001). "Novel molecular defects in the androgen receptor gene of Mexican patients with androgen insensitivity." Clin Genet **59**(3): 185-8.
- Chen, C. D., D. S. Welsbie, et al. (2004). "Molecular determinants of resistance to antiandrogen therapy." Nat Med **10**(1): 33-9.

- Chen, D., H. Ma, et al. (1999). "Regulation of transcription by a protein methyltransferase." Science **284**(5423): 2174-7.
- Chen, S., Y. Xu, et al. (2006). "Androgen receptor phosphorylation and stabilization in prostate cancer by cyclin-dependent kinase 1." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(43): 15969-74.
- Chen, T., L. H. Wang, et al. (2000). "Interleukin 6 activates androgen receptor-mediated gene expression through a signal transducer and activator of transcription 3-dependent pathway in LNCaP prostate cancer cells." Cancer Res **60**(8): 2132-5.
- Cheng, J., D. Wang, et al. (2004). "SEN1 enhances androgen receptor-dependent transcription through desumoylation of histone deacetylase 1." Mol Cell Biol **24**(13): 6021-8.
- Cheng, S., S. Brzostek, et al. (2002). "Inhibition of the dihydrotestosterone-activated androgen receptor by nuclear receptor corepressor." Mol Endocrinol **16**(7): 1492-501.
- Cheung, P., C. D. Allis, et al. (2000). "Signaling to chromatin through histone modifications." Cell **103**(2): 263-71.
- Ciechanover, A., A. Orian, et al. (2000). "The ubiquitin-mediated proteolytic pathway: mode of action and clinical implications." J Cell Biochem Suppl **34**: 40-51.
- Cinar, B., A. De Benedetti, et al. (2005). "Post-transcriptional regulation of the androgen receptor by Mammalian target of rapamycin." Cancer Res **65**(7): 2547-53.
- Claessens, F., G. Verrijdt, et al. (2001). "Selective DNA binding by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific gene regulation." J Steroid Biochem Mol Biol **76**(1-5): 23-30.



- Clarke, R., H. W. van den Berg, et al. (1990). "Reduction of the membrane fluidity of human breast cancer cells by tamoxifen and 17 beta-estradiol." J Natl Cancer Inst **82**(21): 1702-5.
- Coffer, P. J., J. Jin, et al. (1998). "Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation." Biochem J **335** ( Pt 1): 1-13.
- Craft, N., Y. Shostak, et al. (1999). "A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase." Nat Med **5**(3): 280-5.
- Cude, K. J., S. C. Dixon, et al. (1999). "The androgen receptor: genetic considerations in the development and treatment of prostate cancer." J Mol Med **77**(5): 419-26.
- Culig, Z., G. Bartsch, et al. (2002). "Interleukin-6 regulates androgen receptor activity and prostate cancer cell growth." Mol Cell Endocrinol **197**(1-2): 231-8.
- Culig, Z., A. Hobisch, et al. (2000). "Androgen receptor--an update of mechanisms of action in prostate cancer." Urol Res **28**(4): 211-9.
- Culig, Z., A. Hobisch, et al. (1993). "Mutant androgen receptor detected in an advanced-stage prostatic carcinoma is activated by adrenal androgens and progesterone." Mol Endocrinol **7**(12): 1541-50.
- Culig, Z., A. Hobisch, et al. (1994). "Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor." Cancer Res **54**(20): 5474-8.
- Culig, Z., A. Hobisch, et al. (1997). "Hyperactive androgen receptor in prostate cancer: what does it mean for new therapy concepts?" Histol Histopathol **12**(3): 781-6.

- Cunningham, B. C. and J. A. Wells (1989). "High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis." Science **244**(4908): 1081-5.
- Datta, S. R., A. Brunet, et al. (1999). "Cellular survival: a play in three Akts." Genes Dev **13**(22): 2905-27.
- Debes, J. D., L. J. Schmidt, et al. (2002). "p300 mediates androgen-independent transactivation of the androgen receptor by interleukin 6." Cancer Res **62**(20): 5632-6.
- Deeb, A., C. Mason, et al. (2005). "Correlation between genotype, phenotype and sex of rearing in 111 patients with partial androgen insensitivity syndrome." Clin Endocrinol (Oxf) **63**(1): 56-62.
- Desai, S. J., A. H. Ma, et al. (2006). "Inappropriate activation of the androgen receptor by nonsteroids: involvement of the Src kinase pathway and its therapeutic implications." Cancer Res **66**(21): 10449-59.
- Di Lorenzo, G., G. Tortora, et al. (2002). "Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer." Clin Cancer Res **8**(11): 3438-44.
- Dotzlaw, H., U. Moehren, et al. (2002). "The amino terminus of the human AR is target for corepressor action and antihormone agonism." Mol Endocrinol **16**(4): 661-73.
- Duval, D., S. Durant, et al. (1983). "Non-genomic effects of steroids. Interactions of steroid molecules with membrane structures and functions." Biochim Biophys Acta **737**(3-4): 409-42.
- Edwards, J. and J. M. Bartlett (2005a). "The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 1: Modifications to the androgen receptor." BJU Int **95**(9): 1320-6.

- Edwards, J. and J. M. Bartlett (2005b). "The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormone-refractory prostate cancer. Part 2: Androgen-receptor cofactors and bypass pathways." BJU Int **95**(9): 1327-35.
- Eichler, J., M. Bienert, et al. (1991). "Evaluation of cotton as a carrier for solid-phase peptide synthesis." Pept Res **4**(5): 296-307.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, et al. (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." Nature **411**(6836): 494-8.
- Falkenstein, E., H. C. Tillmann, et al. (2000). "Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects." Pharmacol Rev **52**(4): 513-56.
- Falkenstein, E. and M. Wehling (2000). "Nongenomically initiated steroid actions." Eur J Clin Invest **30 Suppl 3**: 51-4.
- Fang, Y., A. E. Fliss, et al. (1996). "Hsp90 regulates androgen receptor hormone binding affinity in vivo." J Biol Chem **271**(45): 28697-702.
- Fang, Y., L. M. Johnson, et al. (2002). "Two phosphorylation-independent sites on the p85 SH2 domains bind A-Raf kinase." Biochem Biophys Res Commun **290**(4): 1267-74.
- Fenteany, G. and S. L. Schreiber (1998). "Lactacystin, proteasome function, and cell fate." J Biol Chem **273**(15): 8545-8.
- Fire, A., S. Xu, et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-11.

- Frank, R. (2002). "The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications." J Immunol Methods **267**(1): 13-26.
- Frank, R. and H. Overwin (1996). "SPOT synthesis. Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes." Methods Mol Biol **66**: 149-69.
- Frank, R. and R. Döring (1988). "Simultaneous multiple synthesis under continuous flow conditions on cellulose paper discs as segmental solid supports." Tetrahedron **44**:6031-6040.
- Franke, T. F. and L. C. Cantley (1997). "Apoptosis. A Bad kinase makes good." Nature **390**(6656): 116-7.
- Fu, M., C. Wang, et al. (2000). "p300 and p300/cAMP-response element-binding protein-associated factor acetylate the androgen receptor at sites governing hormone-dependent transactivation." J Biol Chem **275**(27): 20853-60.
- Fujimoto, N., S. Yeh, et al. (1999). "Cloning and characterization of androgen receptor coactivator, ARA55, in human prostate." J Biol Chem **274**(12): 8316-21.
- Gast, A., J. Schneikert, et al. (1998). "N-terminal sequences of the human androgen receptor in DNA binding and transrepressing functions." J Steroid Biochem Mol Biol **65**(1-6): 117-23.
- Gelmann, E. P. (2002). "Molecular biology of the androgen receptor." J Clin Oncol **20**(13): 3001-15.
- Gerber, H. P., K. Seipel, et al. (1994). "Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches." Science **263**(5148): 808-11.

- Gioeli, D., S. B. Ficarro, et al. (2002). "Androgen receptor phosphorylation. Regulation and identification of the phosphorylation sites." J Biol Chem **277**(32): 29304-14.
- Graff, J. R., B. W. Konicek, et al. (2000). "Increased AKT activity contributes to prostate cancer progression by dramatically accelerating prostate tumor growth and diminishing p27Kip1 expression." J Biol Chem **275**(32): 24500-5.
- Green, S., I. Issemann, et al. (1988). "A versatile in vivo and in vitro eukaryotic expression vector for protein engineering." Nucleic Acids Res **16**(1): 369.
- Gregory, C. W., X. Fei, et al. (2004). "Epidermal growth factor increases coactivation of the androgen receptor in recurrent prostate cancer." J Biol Chem **279**(8): 7119-30.
- Gregory, C. W., B. He, et al. (2001). "A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy." Cancer Res **61**(11): 4315-9.
- Grossmann, M. E., H. Huang, et al. (2001). "Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer." J Natl Cancer Inst **93**(22): 1687-97.
- Guo, Z., W. P. Benten, et al. (2002). "Nongenomic testosterone calcium signaling. Genotropic actions in androgen receptor-free macrophages." J Biol Chem **277**(33): 29600-7.
- Guo, Z., B. Dai, et al. (2006). "Regulation of androgen receptor activity by tyrosine phosphorylation." Cancer Cell **10**(4): 309-19.
- Haapala, K., E. R. Hyytinen, et al. (2001). "Androgen receptor alterations in prostate cancer relapsed during a combined androgen blockade by orchiectomy and bicalutamide." Lab Invest **81**(12): 1647-51.

- Haelens, A., G. Verrijdt, et al. (2003). "DNA recognition by the androgen receptor: evidence for an alternative DNA-dependent dimerization, and an active role of sequences flanking the response element on transactivation." Biochem J **369**(Pt 1): 141-51.
- Haendler, B. (2002). "Androgen-selective gene regulation in the prostate." Biomed Pharmacother **56**(2): 78-83.
- Hamdy, F. C. and B. G. Thomas (2001). "New therapeutic concepts in prostate cancer." BJU Int **88 Suppl 2**: 43-8; discussion 49-50.
- He, B., J. A. Kemppainen, et al. (2000). "FXXLF and WXXLF sequences mediate the NH2-terminal interaction with the ligand binding domain of the androgen receptor." J Biol Chem **275**(30): 22986-94.
- He, B. and E. M. Wilson (2002). "The NH(2)-terminal and carboxyl-terminal interaction in the human androgen receptor." Mol Genet Metab **75**(4): 293-8.
- He, B. and E. M. Wilson (2003). "Electrostatic modulation in steroid receptor recruitment of LXXLL and FXXLF motifs." Mol Cell Biol **23**(6): 2135-50.
- Heery, D. M., E. Kalkhoven, et al. (1997). "A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors." Nature **387**(6634): 733-6.
- Heinlein, C. A. and C. Chang (2002). "The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions." Mol Endocrinol **16**(10): 2181-7.
- Hellawell, G. O., D. J. Ferguson, et al. (2003). "Chemosensitization of human prostate cancer using antisense agents targeting the type 1 insulin-like growth factor receptor." BJU Int **91**(3): 271-7.

- Hilt, W. and D. H. Wolf (2004). "The ubiquitin-proteasome system: past, present and future." Cell Mol Life Sci **61**(13): 1545.
- Hobisch, A., I. E. Eder, et al. (1998). "Interleukin-6 regulates prostate-specific protein expression in prostate carcinoma cells by activation of the androgen receptor." Cancer Res **58**(20): 4640-5.
- Hresko, R. C., H. Murata, et al. (2003). "Phosphoinositide-dependent kinase-2 is a distinct protein kinase enriched in a novel cytoskeletal fraction associated with adipocyte plasma membranes." J Biol Chem **278**(24): 21615-22.
- Hsing, A. W., S. Chua, Jr., et al. (2001). "Prostate cancer risk and serum levels of insulin and leptin: a population-based study." J Natl Cancer Inst **93**(10): 783-9.
- Hu, Y. C., S. Yeh, et al. (2004). "Functional domain and motif analyses of androgen receptor coregulator ARA70 and its differential expression in prostate cancer." J Biol Chem **279**(32): 33438-46.
- Hur, E., S. J. Pfaff, et al. (2004). "Recognition and accommodation at the androgen receptor coactivator binding interface." PLoS Biol **2**(9): E274.
- Ignatiuk, A., J. P. Quickfall, et al. (2006). "The smaller isoforms of ankyrin 3 bind to the p85 subunit of phosphatidylinositol 3'-kinase and enhance platelet-derived growth factor receptor down-regulation." J Biol Chem **281**(9): 5956-64.
- Ilkonen, T., J. J. Palvimo, et al. (1997). "Interaction between the amino- and carboxyl-terminal regions of the rat androgen receptor modulates transcriptional activity and is influenced by nuclear receptor coactivators." J Biol Chem **272**(47): 29821-8.

- Isaacs, J. T. (1999). "The biology of hormone refractory prostate cancer. Why does it develop?" Urol Clin North Am **26**(2): 263-73.
- Isaacs, J. T. and W. B. Isaacs (2004). "Androgen receptor outwits prostate cancer drugs." Nat Med **10**(1): 26-7.
- Jaworski, T. (2006). "Degradation and beyond: Control of androgen receptor activity by the proteasome system." Cell Mol Biol Lett **11**(1): 109-31.
- Jenster, G. (2000). "Ligand-independent activation of the androgen receptor in prostate cancer by growth factors and cytokines." J Pathol **191**(3): 227-8.
- Jenster, G., H. A. van der Korput, et al. (1995). "Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor." J Biol Chem **270**(13): 7341-6.
- Jenster, G., H. A. van der Korput, et al. (1991). "Domains of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation, and subcellular localization." Mol Endocrinol **5**(10): 1396-404.
- Jongsma, J., M. H. Oomen, et al. (2000). "Androgen-independent growth is induced by neuropeptides in human prostate cancer cell lines." Prostate **42**(1): 34-44.
- Kadowaki, T., K. Tobe, et al. (1996). "Signal transduction mechanism of insulin and insulin-like growth factor-1." Endocr J **43 Suppl**: S33-41.
- Kaighn, M. E., J. F. Lechner, et al. (1980). "The Pasadena cell lines." Prog Clin Biol Res **37**: 85-109.
- Kaltz-Wittmer, C., U. Klenk, et al. (2000). "FISH analysis of gene aberrations (MYC, CCND1, ERBB2, RB, and AR) in advanced prostatic carcinomas before and after androgen deprivation therapy." Lab Invest **80**(9): 1455-64.



- Kang, H. Y., S. Yeh, et al. (1999). "Cloning and characterization of human prostate coactivator ARA54, a novel protein that associates with the androgen receptor." J Biol Chem **274**(13): 8570-6.
- Kang, Z., A. Pirsanen, et al. (2002). "Involvement of proteasome in the dynamic assembly of the androgen receptor transcription complex." J Biol Chem **277**(50): 48366-71.
- Kaspar, F., H. Klocker, et al. (1993). "A mutant androgen receptor from patients with Reifenstein syndrome: identification of the function of a conserved alanine residue in the D box of steroid receptors." Mol Cell Biol **13**(12): 7850-8.
- Katome, T., T. Obata, et al. (2003). "Use of RNA interference-mediated gene silencing and adenoviral overexpression to elucidate the roles of AKT/protein kinase B isoforms in insulin actions." J Biol Chem **278**(30): 28312-23.
- Kelly, M. J. and E. J. Wagner (1999). "Estrogen Modulation of G-protein-coupled Receptors." Trends Endocrinol Metab **10**(9): 369-374.
- King, T. R., Y. Fang, et al. (2000). "Using a phage display library to identify basic residues in A-Raf required to mediate binding to the Src homology 2 domains of the p85 subunit of phosphatidylinositol 3'-kinase." J Biol Chem **275**(46): 36450-6.
- Kleinerman, D. I., P. Troncoso et al. (1996) "Expression and structure of the androgen receptor in bone metastases of hormone refractory prostate cancer." Abstract zur Präsentation in: Proceedings of the American Urological Association **155**, Suppl. 624A.
- Klippel, A., C. Reinhard, et al. (1996). "Membrane localization of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to activate multiple signal-transducing kinase pathways." Mol Cell Biol **16**(8): 4117-27.

- Koh, S. S., D. Chen, et al. (2001). "Synergistic enhancement of nuclear receptor function by p160 coactivators and two coactivators with protein methyltransferase activities." J Biol Chem **276**(2): 1089-98.
- Koivisto, P., J. Kononen, et al. (1997). "Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer." Cancer Res **57**(2): 314-9.
- Konety, B. R. and R. H. Getzenberg (1997). "Novel therapies for advanced prostate cancer." Semin Urol Oncol **15**(1): 33-42.
- Kops, G. J. and B. M. Burgering (1999). "Forkhead transcription factors: new insights into protein kinase B (c-akt) signaling." J Mol Med **77**(9): 656-65.
- Kotaja, N., U. Karvonen, et al. (2002). "The nuclear receptor interaction domain of GRIP1 is modulated by covalent attachment of SUMO-1." J Biol Chem **277**(33): 30283-8.
- Kousteni, S., T. Bellido, et al. (2001). "Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity." Cell **104**(5): 719-30.
- Kozak, M. (1981). "Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes." Nucleic Acids Res **9**(20): 5233-52.
- Kramer, A., U. Reineke, et al. (1999). "Spot synthesis: observations and optimizations." J Pept Res **54**(4): 319-27.
- Kraus, W. L., E. M. McInerney, et al. (1995). "Ligand-dependent, transcriptionally productive association of the amino- and carboxyl-terminal regions of a steroid hormone nuclear receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(26): 12314-8.

- Krückl, S. L., R. A. Sikes, et al. (2004). "Increased insulin-like growth factor I receptor expression and signaling are components of androgen-independent progression in a lineage-derived prostate cancer progression model." Cancer Res **64**(23): 8620-9.
- Krugmann, S. and H. Welch (1998). "PI 3-kinase." Curr Biol **8**(23): R828.
- Kuramochi, H., H. Nakata, et al. (1979). "Mechanism of association of a specific aldehyde inhibitor, leupeptin, with bovine trypsin." J Biochem (Tokyo) **86**(5): 1403-10.
- Laganiere, J., G. Deblois, et al. (2005). "From the Cover: Location analysis of estrogen receptor alpha target promoters reveals that FOXA1 defines a domain of the estrogen response." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(33): 11651-6.
- Lamharzi, N., A. V. Schally, et al. (1998). "Growth hormone-releasing hormone antagonist MZ-5-156 inhibits growth of DU-145 human androgen-independent prostate carcinoma in nude mice and suppresses the levels and mRNA expression of insulin-like growth factor II in tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 8864-8.
- Landgraf, C., S. Panni, et al. (2004). "Protein interaction networks by proteome peptide scanning." PLoS Biol **2**(1): E14.
- Langley, E., J. A. Kemppainen, et al. (1998). "Intermolecular NH<sub>2</sub>-carboxyl-terminal interactions in androgen receptor dimerization revealed by mutations that cause androgen insensitivity." J Biol Chem **273**(1): 92-101.
- Laudet, V., C. Hanni, et al. (1992). "Evolution of the nuclear receptor gene superfamily." Embo J **11**(3): 1003-13.

- Le Douarin, B., E. vom Baur, et al. (1996). "Ligand-dependent interaction of nuclear receptors with potential transcriptional intermediary factors (mediators)." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **351**(1339): 569-78.
- Le Mellay, V., B. Grosse, et al. (1997). "Phospholipase C beta and membrane action of calcitriol and estradiol." J Biol Chem **272**(18): 11902-7.
- Ledig, S., S. Jakubiczka, et al. (2005). "Novel and recurrent mutations in patients with androgen insensitivity syndromes." Horm Res **63**(6): 263-9.
- Lee, D. K. and C. Chang (2003). "Molecular communication between androgen receptor and general transcription machinery." J Steroid Biochem Mol Biol **84**(1): 41-9.
- Lee, D. K., H. O. Duan, et al. (2000). "From androgen receptor to the general transcription factor TFIIH. Identification of cdk activating kinase (CAK) as an androgen receptor NH(2)-terminal associated coactivator." J Biol Chem **275**(13): 9308-13.
- Leo, C. and J. D. Chen (2000). "The SRC family of nuclear receptor coactivators." Gene **245**(1): 1-11.
- Liang, J. and J. M. Slingerland (2003). "Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression." Cell Cycle **2**(4): 339-45.
- Liao, G., L. Y. Chen, et al. (2003). "Regulation of androgen receptor activity by the nuclear receptor corepressor SMRT." J Biol Chem **278**(7): 5052-61.
- Lieberherr, M. and B. Grosse (1994). "Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein." J Biol Chem **269**(10): 7217-23.
- Lin, H. K., Y. C. Hu, et al. (2004). "Regulation of androgen receptor signaling by PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10)

- tumor suppressor through distinct mechanisms in prostate cancer cells." Mol Endocrinol **18**(10): 2409-23.
- Lin, H. K., L. Wang, et al. (2002). "Phosphorylation-dependent ubiquitylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase." Embo J **21**(15): 4037-48.
- Lin, H. K., S. Yeh, et al. (2001). "Akt suppresses androgen-induced apoptosis by phosphorylating and inhibiting androgen receptor." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7200-5.
- Linja, M. J., K. J. Savinainen, et al. (2001). "Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer." Cancer Res **61**(9): 3550-5.
- Litvinov, I. V., D. J. Vander Griend, et al. (2006). "Androgen receptor as a licensing factor for DNA replication in androgen-sensitive prostate cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(41): 15085-90.
- Lopaczynski, W. (1999). "Differential regulation of signaling pathways for insulin and insulin-like growth factor I." Acta Biochim Pol **46**(1): 51-60.
- Lubahn, D. B., D. R. Joseph, et al. (1988). "Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome." Science **240**(4850): 327-30.
- Lumbroso et al. (1999) 81st. US Endo Soc Meetings, Abstr. P3-288.
- Ma, H., C. T. Baumann, et al. (2001). "Hormone-dependent, CARM1-directed, arginine-specific methylation of histone H3 on a steroid-regulated promoter." Curr Biol **11**(24): 1981-5.

- MacDougall, L. K., J. Domin, et al. (1995). "A family of phosphoinositide 3-kinases in *Drosophila* identifies a new mediator of signal transduction." Curr Biol **5**(12): 1404-15.
- Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, et al. (1995). "The nuclear receptor superfamily: the second decade." Cell **83**(6): 835-9.
- Marcelli, M., M. Ittmann, et al. (2000). "Androgen receptor mutations in prostate cancer." Cancer Res **60**(4): 944-9.
- Marcelli, M., W. D. Tilley, et al. (1990). "A single nucleotide substitution introduces a premature termination codon into the androgen receptor gene of a patient with receptor-negative androgen resistance." J Clin Invest **85**(5): 1522-8.
- Marcelli, M., S. Zoppi, et al. (1994). "Amino acid substitutions in the hormone-binding domain of the human androgen receptor alter the stability of the hormone receptor complex." J Clin Invest **94**(4): 1642-50.
- Matias, P. M., P. Donner, et al. (2000). "Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor. Implications for pathogenic gene mutations." J Biol Chem **275**(34): 26164-71.
- McEwan, I. J. and J. Gustafsson (1997). "Interaction of the human androgen receptor transactivation function with the general transcription factor TFIIF." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(16): 8485-90.
- McKenna, N. J. and B. W. O'Malley (2002). "Minireview: nuclear receptor coactivators--an update." Endocrinology **143**(7): 2461-5.
- Mellinghoff, I. K., I. Vivanco, et al. (2004). "HER2/neu kinase-dependent modulation of androgen receptor function through effects on DNA binding and stability." Cancer Cell **6**(5): 517-27.

- Melo, K. F., B. B. Mendonca, et al. (2003). "Clinical, hormonal, behavioral, and genetic characteristics of androgen insensitivity syndrome in a Brazilian cohort: five novel mutations in the androgen receptor gene." J Clin Endocrinol Metab **88**(7): 3241-50.
- Mestayer, C., M. Blanchere, et al. (2003). "Expression of androgen receptor coactivators in normal and cancer prostate tissues and cultured cell lines." Prostate **56**(3): 192-200.
- Metzger, E., M. Wissmann, et al. (2005). "LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription." Nature **437**(7057): 436-9.
- Migliaccio, A., G. Castoria, et al. (2000). "Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-Src complex triggers prostate cancer cell proliferation." Embo J **19**(20): 5406-17.
- Migliaccio, A., M. Di Domenico, et al. (1996). "Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells." Embo J **15**(6): 1292-300.
- Misawa, H., M. Ohtsubo, et al. (1998). "Cloning and characterization of a novel class II phosphoinositide 3-kinase containing C2 domain." Biochem Biophys Res Commun **244**(2): 531-9.
- Molendijk, A. J. and R. F. Irvine (1998). "Inositide signalling in Chlamydomonas: characterization of a phosphatidylinositol 3-kinase gene." Plant Mol Biol **37**(1): 53-66.
- Nakayama, T., M. Watanabe, et al. (2000). "Epigenetic regulation of androgen receptor gene expression in human prostate cancers." Lab Invest **80**(12): 1789-96.

- Nazareth, L. V. and N. L. Weigel (1996). "Activation of the human androgen receptor through a protein kinase A signaling pathway." J Biol Chem **271**(33): 19900-7.
- Newmark, J. R., D. O. Hardy, et al. (1992). "Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(14): 6319-23.
- Nickerson, T., F. Chang, et al. (2001). "In vivo progression of LAPC-9 and LNCaP prostate cancer models to androgen independence is associated with increased expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) and IGF-I receptor (IGF-IR)." Cancer Res **61**(16): 6276-80.
- Ning, G., V. Jurecic, et al. (1999). "Structure and chromosomal locations of mouse steroid receptor coactivator gene family." In Vitro Cell Dev Biol Anim **35**(8): 481-6.
- Nishida, T. and H. Yasuda (2002). "PIAS1 and PIASxalpha function as SUMO-E3 ligases toward androgen receptor and repress androgen receptor-dependent transcription." J Biol Chem **277**(44): 41311-7.
- Nolte, R. T., M. J. Eck, et al. (1996). "Crystal structure of the PI 3-kinase p85 amino-terminal SH2 domain and its phosphopeptide complexes." Nat Struct Biol **3**(4): 364-74.
- Pawson, T. and J. Schlessingert (1993). "SH2 and SH3 domains." Curr Biol **3**(7): 434-42.
- Peterziel, H., S. Mink, et al. (1999). "Rapid signalling by androgen receptor in prostate cancer cells." Oncogene **18**(46): 6322-9.
- Pillay, C. S., E. Elliott, et al. (2002). "Endolysosomal proteolysis and its regulation." Biochem J **363**(Pt 3): 417-29.



- Poukka, H., U. Karvonen, et al. (2000). "Covalent modification of the androgen receptor by small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO-1)." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(26): 14145-50.
- Prins, G. S. (2000). "Molecular biology of the androgen receptor." Mayo Clin Proc **75 Suppl**: S32-5.
- Quigley, C. A., A. De Bellis, et al. (1995). "Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives." Endocr Rev **16**(3): 271-321.
- Raffo, A. J., H. Perlman, et al. (1995). "Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo." Cancer Res **55**(19): 4438-45.
- Reid, J., I. Murray, et al. (2002). "The androgen receptor interacts with multiple regions of the large subunit of general transcription factor TFIIF." J Biol Chem **277**(43): 41247-53.
- Rennie, P. S., N. Bruchovsky, et al. (1993). "Characterization of two cis-acting DNA elements involved in the androgen regulation of the probasin gene." Mol Endocrinol **7**(1): 23-36.
- Riegman, P. H., R. J. Vlietstra, et al. (1991). "The promoter of the prostate-specific antigen gene contains a functional androgen responsive element." Mol Endocrinol **5**(12): 1921-30.
- Ripple, G. H. and G. Wilding (1999). "Drug development in prostate cancer." Semin Oncol **26**(2): 217-26.
- Roy, A. K., Y. Lavrovsky, et al. (1999). "Regulation of androgen action." Vitam Horm **55**: 309-52.

- Roy, A. K., R. K. Tyagi, et al. (2001). "Androgen receptor: structural domains and functional dynamics after ligand-receptor interaction." Ann N Y Acad Sci **949**: 44-57.
- Sack, J. S., K. F. Kish, et al. (2001). "Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(9): 4904-9.
- Schoenmakers, E., G. Verrijdt, et al. (2000). "Differences in DNA binding characteristics of the androgen and glucocorticoid receptors can determine hormone-specific responses." J Biol Chem **275**(16): 12290-7.
- Schurter, B. T., S. S. Koh, et al. (2001). "Methylation of histone H3 by coactivator-associated arginine methyltransferase 1." Biochemistry **40**(19): 5747-56.
- Shang, Y., M. Myers, et al. (2002). "Formation of the androgen receptor transcription complex." Mol Cell **9**(3): 601-10.
- Shatkina, L., S. Mink, et al. (2003). "The cochaperone Bag-1L enhances androgen receptor action via interaction with the NH2-terminal region of the receptor." Mol Cell Biol **23**(20): 7189-97.
- Shepherd, P. R., D. J. Withers, et al. (1998). "Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling." Biochem J **333** ( Pt 3): 471-90.
- Siegal, G., B. Davis, et al. (1998). "Solution structure of the C-terminal SH2 domain of the p85 alpha regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase." J Mol Biol **276**(2): 461-78.
- Simental, J. A., M. Sar, et al. (1991). "Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor." J Biol Chem **266**(1): 510-8.

- Smith, D. B. and K. S. Johnson (1988). "Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase." Gene **67**(1): 31-40.
- Smith, D. F. and D. O. Toft (1993). "Steroid receptors and their associated proteins." Mol Endocrinol **7**(1): 4-11.
- Songyang, Z., S. E. Shoelson, et al. (1993). "SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences." Cell **72**(5): 767-78.
- Sramkoski, R. M., T. G. Pretlow, 2nd, et al. (1999). "A new human prostate carcinoma cell line, 22Rv1." In Vitro Cell Dev Biol Anim **35**(7): 403-9.
- Steinsapir, J., R. Socci, et al. (1991). "Effects of androgen on intracellular calcium of LNCaP cells." Biochem Biophys Res Commun **179**(1): 90-6.
- Stone, K. R., D. D. Mickey, et al. (1978). "Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145)." Int J Cancer **21**(3): 274-81.
- Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." Nature **403**(6765): 41-5.
- Sun, M., L. Yang, et al. (2003). "Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway by androgen through interaction of p85alpha, androgen receptor, and Src." J Biol Chem **278**(44): 42992-3000.
- Suzuki, H., T. Ueda, et al. (2003). "Androgen receptor involvement in the progression of prostate cancer." Endocr Relat Cancer **10**(2): 209-16.
- Takahashi, H., M. Furusato, et al. (1995). "Prevalence of androgen receptor gene mutations in latent prostatic carcinomas from Japanese men." Cancer Res **55**(8): 1621-4.

- Tan, J., Y. Sharief, et al. (1997). "Dehydroepiandrosterone activates mutant androgen receptors expressed in the androgen-dependent human prostate cancer xenograft CWR22 and LNCaP cells." Mol Endocrinol **11**(4): 450-9.
- Taplin, M. E., B. Rajeshkumar, et al. (2003). "Androgen receptor mutations in androgen-independent prostate cancer: Cancer and Leukemia Group B Study 9663." J Clin Oncol **21**(14): 2673-8.
- Tesarik, J. and C. Mendoza (1995). "Nongenomic effects of 17 beta-estradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential." J Clin Endocrinol Metab **80**(4): 1438-43.
- Thomas, D. and M. Tyers (2000). "Transcriptional regulation: Kamikaze activators." Curr Biol **10**(9): R341-3.
- Tilley, W. D., G. Buchanan, et al. (1996). "Mutations in the androgen receptor gene are associated with progression of human prostate cancer to androgen independence." Clin Cancer Res **2**(2): 277-85.
- Trachtenberg, J. (2001). "Emerging pharmacologic therapies for prostate cancer." Rev Urol **3 Suppl 3**: S23-8.
- Trapman, J., P. Klaassen, et al. (1988). "Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor." Biochem Biophys Res Commun **153**(1): 241-8.
- Truss, M. and M. Beato (1993). "Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors." Endocr Rev **14**(4): 459-79.
- Tsai, M. J. and B. W. O'Malley (1994). "Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members." Annu Rev Biochem **63**: 451-86.

- Ueda, T., N. Bruchovsky, et al. (2002a). "Activation of the androgen receptor N-terminal domain by interleukin-6 via MAPK and STAT3 signal transduction pathways." J Biol Chem **277**(9): 7076-85.
- Ueda, T., N. R. Mawji, et al. (2002b). "Ligand-independent activation of the androgen receptor by interleukin-6 and the role of steroid receptor coactivator-1 in prostate cancer cells." J Biol Chem **277**(41): 38087-94.
- Vander Griend, D. J., I. V. Litvinov, et al. (2007). "Stabilizing androgen receptor in mitosis inhibits prostate cancer proliferation." Cell Cycle **6**(6): 647-51.
- Vanhaesebroeck, B., S. J. Leever, et al. (1997). "Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers." Trends Biochem Sci **22**(7): 267-72.
- Veldscholte, J., C. A. Berrevoets, et al. (1992a). "Anti-androgens and the mutated androgen receptor of LNCaP cells: differential effects on binding affinity, heat-shock protein interaction, and transcription activation." Biochemistry **31**(8): 2393-9.
- Veldscholte, J., C. A. Berrevoets, et al. (1992b). "Hormone-induced dissociation of the androgen receptor-heat-shock protein complex: use of a new monoclonal antibody to distinguish transformed from nontransformed receptors." Biochemistry **31**(32): 7422-30.
- Veldscholte, J., C. Ris-Stalpers, et al. (1990). "A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens." Biochem Biophys Res Commun **173**(2): 534-40.
- Verrijdt, G., A. Haelens, et al. (2003). "Selective DNA recognition by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific regulation of gene expression." Mol Genet Metab **78**(3): 175-85.

- Verrijdt, G., E. Schoenmakers, et al. (2000). "Change of specificity mutations in androgen-selective enhancers. Evidence for a role of differential DNA binding by the androgen receptor." J Biol Chem **275**(16): 12298-305.
- Visakorpi, T., E. Hyytinen, et al. (1995). "In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer." Nat Genet **9**(4): 401-6.
- Watters, J. J., J. S. Campbell, et al. (1997). "Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription." Endocrinology **138**(9): 4030-3.
- Wehling, M. (1997). "Specific, nongenomic actions of steroid hormones." Annu Rev Physiol **59**: 365-93.
- Wen, Y., M. C. Hu, et al. (2000). "HER-2/neu promotes androgen-independent survival and growth of prostate cancer cells through the Akt pathway." Cancer Res **60**(24): 6841-5.
- Whiting, K. P., C. J. Restall, et al. (2000). "Steroid hormone-induced effects on membrane fluidity and their potential roles in non-genomic mechanisms." Life Sci **67**(7): 743-57.
- Wieacker, P., J. E. Griffin, et al. (1987). "Linkage analysis with RFLPs in families with androgen resistance syndromes: evidence for close linkage between the androgen receptor locus and the DXS1 segment." Hum Genet **76**(3): 248-52.
- Wurtz, J. M., W. Bourguet, et al. (1996). "A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors." Nat Struct Biol **3**(2): 206.
- Wymann, M. P. and L. Pirola (1998). "Structure and function of phosphoinositide 3-kinases." Biochim Biophys Acta **1436**(1-2): 127-50.

- Xiao, G. H., M. Jeffers, et al. (2001). "Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(1): 247-52.
- Yang, L., L. Wang, et al. (2003). "Interleukin-6 differentially regulates androgen receptor transactivation via PI3K-Akt, STAT3, and MAPK, three distinct signal pathways in prostate cancer cells." Biochem Biophys Res Commun **305**(3): 462-9.
- Yeh, S., H. K. Lin, et al. (1999). "From HER2/Neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: a novel pathway by induction of androgen target genes through MAP kinase in prostate cancer cells." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(10): 5458-63.
- Zhou, Z. X., M. V. Lane, et al. (1995). "Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability." Mol Endocrinol **9**(2): 208-18.
- Zhou, Z. X., M. Sar, et al. (1994a). "A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. Requirement for the DNA-binding domain and modulation by NH<sub>2</sub>-terminal and carboxyl-terminal sequences." J Biol Chem **269**(18): 13115-23.
- Zhou, Z. X., C. I. Wong, et al. (1994b). "The androgen receptor: an overview." Recent Prog Horm Res **49**: 249-74.
- Zhu, Z., R. R. Becklin, et al. (2001). "Identification of a novel phosphorylation site in human androgen receptor by mass spectrometry." Biochem Biophys Res Commun **284**(3): 836-44.





## 7 Abkürzungen und Einheiten

### Abkürzungen

A	Alanin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Androgenrezeptor
AR <sub>wt</sub>	Wildtyp-Androgenrezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
Bq	Bequerel
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserum-Albumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cystein
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCS	<i>Charcoal/Dextran treated FBS</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> (zur RNA komplementäre, einzelsträngige DNA)
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
d	Durchmesser
d.h.	das heißt
DBD	DNA-Bindedomäne
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagles´s Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP´s	<i>desoxy-nukleosid-triphosphate</i>
DTT	Dithiothreitol

## Abkürzungen und Einheiten

---

<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> (epidermaler Wachstumsfaktor)
ERK	<i>Extracellular Regulated Kinase</i> (Extrazellulär-regulierte Kinase)
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
EtOH	Ethanol
FBS	<i>fetal bovine serum</i> (fötales Kälberserum)
GST	Glutathion-S-Transferase
H	Histidin
H <sub>2</sub> O	Wasser
HBD	Hormonbindedomäne
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HRE	<i>hormone response element</i> (Hormon responsives Element)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettich Peroxidase)
Hsp	Hitzeschockprotein
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K	Lysin
kb	Kilobase(n)
L	Leucin
LB	Luria Bertani
Luc	Luziferase
M	Methionin
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)
MBq	Megabequerel
MEK	MAPK/ERK-Kinase
MMTV	<i>mouse mammary tumor virus</i>
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure

## Abkürzungen und Einheiten

---

mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
NTC	<i>no template control</i>
OD	optische Dichte
P	Prolin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	<i>Potentia Hydrogenii</i> (dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIC	<i>Protease Inhibitor Cocktail</i>
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Q	Glutamin
R	Arginin
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Kulturmedium)
RT	Raumtemperatur
S	Serin
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Azetat/EDTA-Elektrophoresepuffer
TBE	Tris/Borsäure/EDTA-Elektrophoresepuffer
TEMED	N,N,N',N''-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i> (Einheit für die Enzymaktivität)
u.a.	unter anderem

## Abkürzungen und Einheiten

---

üN	über Nacht
UV	ultraviolette Strahlung
Vol.	Volumen
W	Tryptophan
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

### Einheiten

A	Amper
mA	Milliamper
kDa	Kilodalton
Da	Dalton
M	mol/l
mM	Millimolar
nM	Nanomolar
pmol	Pikomol
g	Gramm
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ng	Nanogramm
L	Liter
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
nm	Nanometer
h	Stunde
min	Minute
s	Sekunde
%	Prozent
°C	Grad Celcius
V	Volt
W	Watt

## 8 Anhang

MEVQLGLGRVYPRPPSKTYRGAFQNLFQSVREVIQNPGRHPEAASAAPPGASLLLLQQ  
 QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQETSPRQQQQQQGEDGSPQAHRRGPTGYLVLDDEEQQPSQPQ  
 SALECHPERGCVPEPGAAVAASKGLPQQLPAPPDEDDSAAPSTLSLLGPTFPGLSSCSA  
 DLKDILSEASTMQLLQQQQQEAVSEGSSSGRAREASGAPTSSKDNYLGGTSTISDNAKE  
 LCKAVSVSMGLGVEALEHLSPGEQLRGDCMYAPLLGVPPAVRPTPCAPLAECKGSLDD  
 SAGKSTEDTAEYSPFKGGYTKGLEGESLGCSGSAAAGSSGTLELPSTLSLYKSGALDEA  
 AAYQSRDYYNFPLALAGPPPPPPPPHAPHARIKLENPLDYGSAAAAAQCRYGDLASLH  
 GAGAAGPGSGSPSAAASSSWHTLFTAEEGQLYGPCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG  
 EAGAVAPYGYTRPPQGLAGQESDFTAPDVWYPGGMVSRVPYPSPTCVKSEMGPWMDSYS  
 GPYGDMRLETARDHVLPIIDYFPPQKTCLICGDEAS

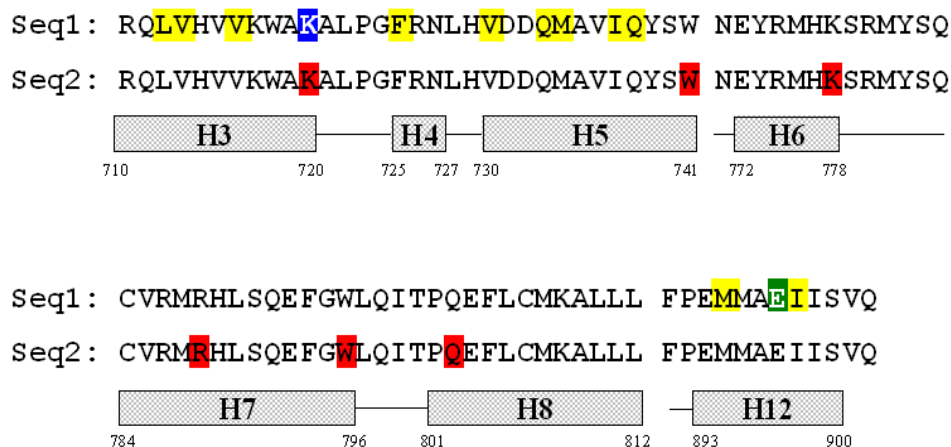
**Abb. A.1: Aminosäuresequenz des humanen Androgenrezeptors (N-Terminus).** Aufgeführt sind die Aminosäuren 1 bis 567 des humanen Androgenrezeptors (N-Terminus) mit der Accession-Nummer M20132. Der abgebildete Sequenzbereich wurde mittels Peptidarray auf Interaktion mit der p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase getestet.

CTIDKFRRKNCPSCLRLKCYEAGMTLGARKLKKLGNLKLQEEGEASSTTSPTTEETTQKL  
 TVSHIEGYECQPIFLNVLEAIEPGVVCAGHDNNQPDFAALLSSLNELGERQLVHVVKW  
 AKALPGFRNLHVDDQMAVIQYSWMGLMVFAMGWSFTNVNSRMLYFAPDLVFNEYRMHK  
 SRMYSQCVRMRHLSQEFQWLQITPQEFLECMKALLLFSIIPVDGLKNQKFFDELRMNYIK  
 ELDRIIACKRKNPTSCSRRFYQLTKLLDSVQPIARELHQFTFDLLIKSHMVSVDPEMM  
 AEIISVQVPKILSGKVKPIYFHTQ

**Abb. A.2: Aminosäuresequenz des humanen Androgenrezeptors (C-Terminus).** Aufgeführt sind die Aminosäuren 600 bis 919 des humanen Androgenrezeptors (Hormonbindedomäne) mit der Accession-Nummer M20132. Der abgebildete Sequenzbereich wurde mittels Peptidarray auf Interaktion mit der p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase getestet.

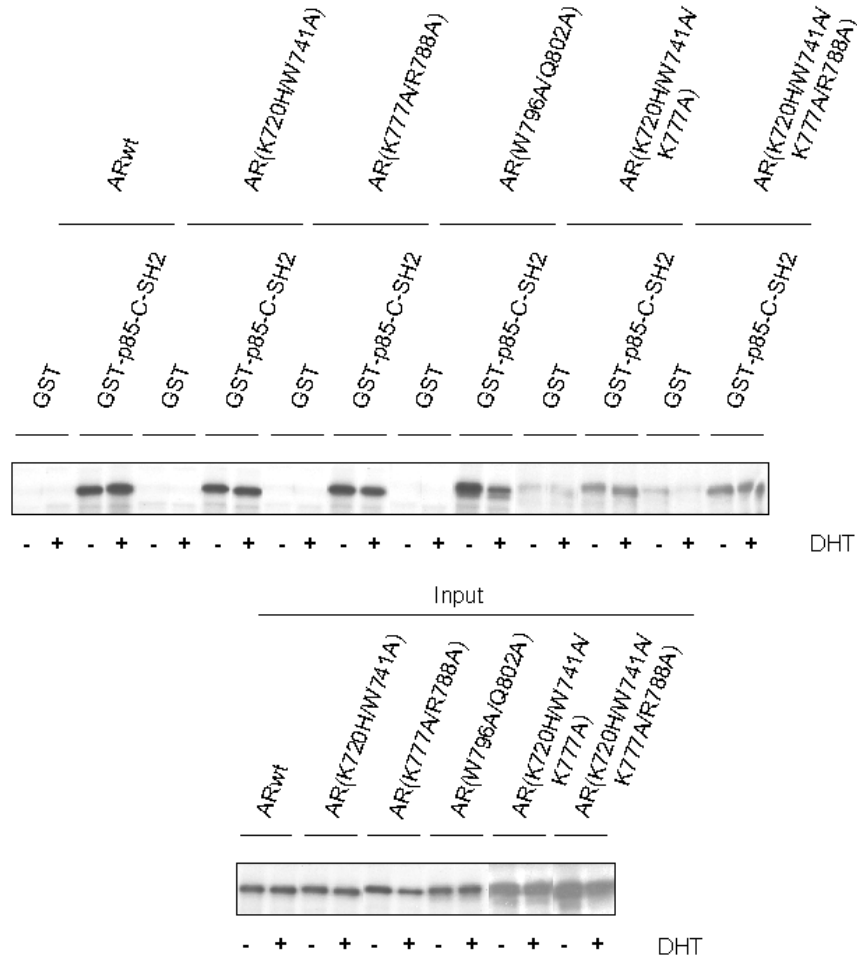
	710	720	730	891
AR	RQLVHVVKWAKALPGFRNLHVDDQMAVTIQYS	FPEMMAETIISV		
GR	RQVIAAVKWAKAIPGFRNLHLDDQMTLLQYS	FPEMLAETITN		
PR	RQLLSVVKWSKSLPGFRNLHIDDQITLIQYS	FPEMMSEVIAA		
MR	KQMIQVVVKWAKVLPGFKNLPLEDQITLIQYS	FPAMLVEIISD		
ER $\alpha$	RELVHMINWAKRVPGFVDLTLHDQVHLLLECA	LYDLLLEMLDA		
ER $\beta$	KELVHMISSWAKKIPGFVELSLFDQVRLLESC	VYDLLLEMLNA		
RAR $\alpha$	KCI IKTVEFAKQLPGFTTLTIADQITLLKAA	MPPLIQEMLLEN		
RAR $\beta$	KCI IKTVEFAKRLPGFTGLTIADQITLLKAA	MPPLIQEMLLEN		
RAR $\gamma$ 1	KCI IKTVEFAKRLPGFTGLSIADQITLLKAA	MPPLIREMLLEN		
RAR $\gamma$ 2	KCI IKTVEFAKRLPGFTGLSIADQITLLKAA	MPPLIREMLLEN		
TR $\alpha$ 1	PAITRVVDFAKKLPMFSELPCEQIILLKGC	FPPLFLEVFEFED		
TR $\beta$ 1	PAITRVVDFAKKLPMFCELPCEQIILLKGC	FPPLFLEVFEFED		
TR $\beta$ 2	PAITRVVDFAKKLPMFCELPCEQIILLKGC	LPPLFLEVFEFED		
PPAR $\alpha$	ETVTELTEFAKAI PGFANLDLNDQVTLLKYG	LHPLLQEITYRD		
PPAR $\delta$	ETVRELTEFAKSIPSFSSFLNDQVTLLKYG	LHPLLQEITYKD		
PPAR $\gamma$	EAVQEITEYAKSIPGFVNLDLNDQVTLLKYG	LHPLLQEITYKD		
RXR $\alpha$	KQLFTLV EWAKRIPHFSSELPDDQVILLRAG	IDTFLMEMLEA		
RXR $\beta$	KQLFTLV EWAKRIPHFSSELPDDQVILLRAG	IDTFLMEMLEA		
RXR $\gamma$	KQLFTLV EWAKRIPHFSDLTLEDQVILLRAG	IDTFLMEMLET		
	H3	H4	H5	H12

**Abb. A.3: Coaktivator-Bindungsfläche für Nuklearrezeptoren.** Die farbig markierten Aminosäuren kennzeichnen die hoch konservierte Coaktivator-Bindungsfläche für zahlreiche Nuklearrezeptoren (Hur *et al.*, 2004).

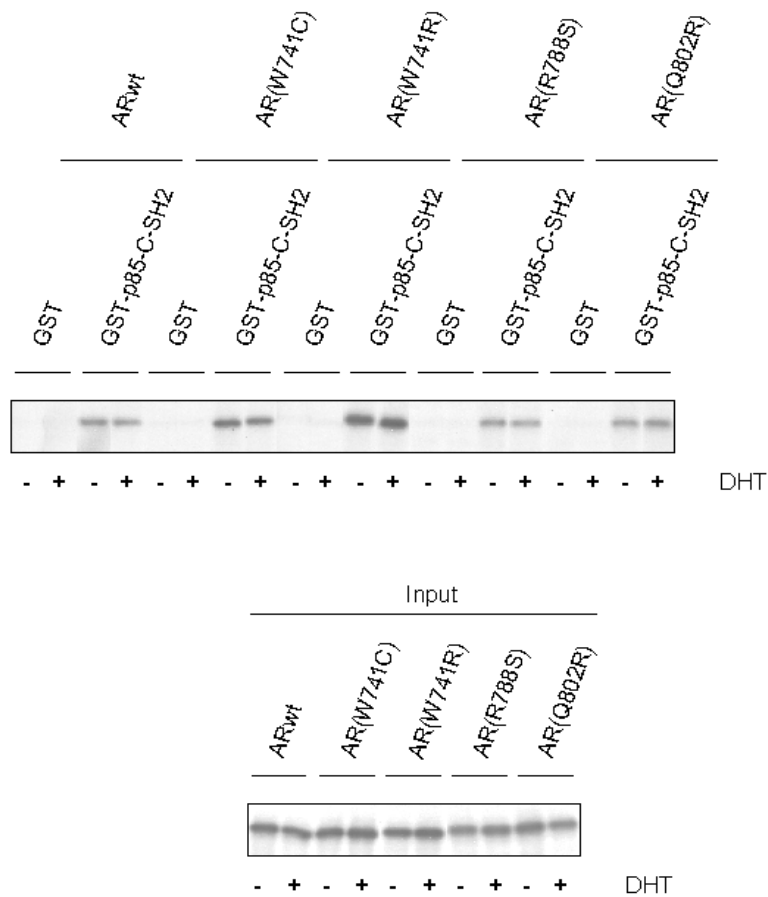


**Abb. A.4: Vergleich der Aminosäuren, welche die Bindungsfläche der AF-2 Transaktivierungsdomäne repräsentieren und den im Peptidarray identifizierten Aminosäuren der Hormonbindedomäne des Androgenrezeptors.** Sowohl Seq1 als auch Seq2 zeigen die Aminosäuresequenz der Hormonbindedomäne des Androgenrezeptors. Die gelb unterlegten Aminosäuren in Seq1 repräsentieren die Bindungsstellen in der AF-2 Transaktivierungsdomäne (Hur *et al.*, 2004). Lysin an Position 720 blau unterlegt und Glutaminsäure an Position 897 grün

unterlegt kennzeichnen hoch konservierte Aminosäuren in den Nuklearrezeptoren. Die rot markierten Aminosäuren in Seq2 sind die im Peptidarray identifizierten Bindungsstellen mit der p85-C-SH2-Domäne der PI3-Kinase. Die grau dargestellten Boxen stellen die Helices der Hormonbindedomäne dar, die durch Röntgenstrukturanalysen identifiziert wurden.



**Abb. A.5: GST-Interaktionsstudien mit GST-p85-C-SH2 und verschiedenen Androgenrezeptor-Doppel- und -Mehrfachmutanten aus der Hormon-bindedomäne.** Das bakteriell exprimierte GST-Fusionsprotein GST-p85-C-SH2 und GST allein als Negativkontrolle wurden an Glutathion-S-Sepharose gekoppelt und mit 10 µl *in vitro* translatiertem, L-[<sup>35</sup>S]-radioaktiv markiertem Androgenrezeptor-Wildtyp und Androgenrezeptor-Mehrfachmutanten der Hormon-bindedomäne inkubiert. Nach der *in vitro* Translation der Androgenrezeptor-Konstrukte AR(K720H, W741A), AR(K777A, R788A), AR(W796A, Q802A), AR(K720H, W741A, K777A) und AR(K720H, W741A, K777A, R788A) wurden diese für 10 min zum einen mit DHT, zum anderen mit dem Lösungsmittel behandelt. Die gebundenen Androgenrezeptor-Konstrukte wurden in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch detektiert. Für den Input wurde jeweils 1 µl der *in vitro* Transkription/Translation der Androgenrezeptor-Konstrukte eingesetzt.



**Abb. A.6: GST-Interaktionsstudien mit GST-p85-C-SH2 und verschiedenen Androgenrezeptor-Punktmutanten mit klinischem Phänotyp.** Das bakteriell exprimierte GST-Fusionsprotein GST-p85-C-SH2 und GST allein als Negativkontrolle wurden an Glutathion-S-Sepharose gekoppelt und mit 10 µl *in vitro* translatiertem, L-[<sup>35</sup>S]-radioaktiv markiertem Androgenrezeptor-Wildtyp und Androgenrezeptor-Punktmutanten der Hormonbindedomäne mit klinischem Phänotyp inkubiert. Nach der *in vitro* Translation der Androgenrezeptor-Konstrukte AR(W741C), AR(W741R), AR(R788S) und AR(Q802R) wurden diese für 10 min zum einen mit DHT, zum anderen mit dem Lösungsmittel behandelt. Die gebundenen Proteine wurden in einem 10 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch detektiert. Für den Input wurde jeweils 1 µl der *in vitro* Transkription/Translation der Androgenrezeptor-Konstrukte eingesetzt.



EDLPHHDEKTWNVGSSNRNKAENLLRGKRDGTFLVRESSKQGCYACSVVVDGEVKHCVI  
NKTATGYGFAEPYNLYSSLKELVLHYQHTSLVQHNDLNVTLAYPVYAQQRR

**Abb. A.7: Aminosäuresequenz der C-SH2-Domäne der p85-Untereinheit der humanen PI3-Kinase.** Aufgeführt sind die Aminosäuren 1 bis 112 der p85-C-SH2-Domäne mit der Accession-Nummer NM\_181523. Der abgebildete Sequenzbereich wurde mittels Peptidarray auf Interaktion mit dem N-Terminus (Aminosäure 1 bis 537) des Androgenrezeptors getestet.

```

      10      20      30      40
      |      |      |      |
(GSPI)PHHDEKT WNV GSS NRNKAENLLR GKRD--G TFLVRES SKQ--G C

      50      60      70
      |      |      |
YACSVVV -----DG EVKHCVI NKT AT- GYGF AEP YNL YS

      80      90     100     110
      |      |      |      |
SLKELVLHYQHT SLVQHNDLNVTLA YPV YAQQRR
  
```

**Abb. A.8: Aminosäuresequenz der C-SH2-Domäne der p85-Untereinheit der PI3-Kinase mit eingezeichneten Phosphotyrosinbindungsstellen.** Die blau unterlegten Aminosäuren repräsentieren die Phosphotyrosinbindungsstellen, die eine sogenannte Phosphotyrosintasche bilden. Die rot umrandete Aminosäure Arginin an Position 36 wurde gegen Methionin ausgetauscht, was eine Phosphotyrosinbindung verhindert (Siegal *et al.*, 1998).



## 9 Danksagung

Herzlicher Dank geht an Herrn Prof. Dr. Andrew C. B. Cato für die Bereitstellung des interessanten Themas, die konstruktive Kritik und die sehr gute Betreuung während der Promotionsarbeit.

Zudem möchte ich Herrn Prof. Dr. Günter Vollmer für sein Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens danken. Weiterer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Aria Banihamad für die Begutachtung der Arbeit.

Für die Synthese der Peptidarrays und Alanin-Substitutionen möchte ich mich bei Frau Dr. Claudia Ester aus der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Uetz am Instituts für Toxikologie und Genetik bedanken.

Herrn Prof. Dr. Moras und Dr. Ruff vom *Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC)* an der *Louis Pasteur University* in Strasbourg danke ich für die Darstellung der identifizierten Aminosäuren in der dreidimensionalen Struktur des Androgenrezeptors und der PI3-Kinase.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an meine Kollegen und ehemaligen Kollegen Anbalagan, Andy, Danilo, Jana, Jutta, Ljuba, Rebecca, Sandra, Sarah und Ute aus Labor 114 für die stets lockere Atmosphäre im Labor, für die fachliche Betreuung, die anregenden Diskussionen und für so manches private Gespräch.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Toxikologie und Genetik, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Katja für die megaschnelle Bereitstellung der orthographischen Korrekturvorschläge bedanken.

Außerdem möchte ich meinem Mann Michael für die unerschöpfliche Geduld, Aufmunterung und die praktische Unterstützung danken.

Besonderer Dank geht an meine Eltern und Schwiegereltern für ihre Unterstützung während meiner Doktorarbeit, das Verständnis und den Glauben an mich.



## **Versicherung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Toxikologie und Genetik des Forschungszentrums Karlsruhe unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. Andrew C. B. Cato angefertigt.

Die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden wird hiermit anerkannt.

Dresden, 23.07.2007

.....

Siw Schmidt



# Curriculum Vitae

## Persönliche Daten:

Name: Siw Schmidt, geb. Schmelzer  
Geburtsdatum: 04.09.1978  
Geburtsort: Freiberg  
Familienstand: verheiratet  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Anschrift: Fronbergstraße 41  
76703 Kraichtal

## Schulausbildung:

1985 – 1991 Erich-Weinert Oberschule in Pretzschendorf  
1991 – 1992 Erweiterte Oberschule in Dippoldiswalde  
1992 – 1997 “Glückauf “ - Gymnasium in Dippoldiswalde  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## Studium:

1997 – 1998 Studium in der Fachrichtung „Angewandte  
Naturwissenschaften“ an der TU Bergakademie Freiberg  
1998 – 2002 Studium in der Fachrichtung „Biologie“ an der Technischen  
Universität Dresden  
2002 – 2003 Diplomarbeit am Forschungszentrum in Karlsruhe im  
Institut für Toxikologie und Genetik unter der  
wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. Andrew  
C. B. Cato

## Promotion:

08/2003 Beginn der Dissertation am Forschungszentrum in  
Karlsruhe im Institut für Toxikologie und Genetik unter der  
wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. Dr. Andrew  
C. B. Cato